חלבונים (פרופ"ח אייל בנגל)

תפקידי החלבונים

1. פעילות אנזימתית- זירוז ריאקציות כימיות בתא.
2. העברה ושימור חומרים- לדוגמא: המוגלובין מעביר חמצן מהריאות לרקמות.
3. תנועתיות האורגניזם- לדוגמא: התכווצות השרירים נעשית על ידי החלבונים.
4. ייצוב מכני של הגוף- על ידי חלבונים מבניים. לדוגמא: קולגן- חלבון הבונה את העצמות ומהווה חלק משכבת העור.
5. תגובה אימונית- התאית והנוגדנית. כל הנוגדנים הם חלבונים.
6. העברת פולס עצבי מתרחש על ידי משאבות יונים שהן חלבונים.
7. בקרה על גידול ודיפרנסיאציה של תאים- העברת אותות מחוץ לתא אל תוך התא נעשה על ידי פקטורי גידול חלבוניים, הנקשרים לרצפטורים שגם הם חלבונים, ומשם סדרת אירועים המעבירה את הסיגנל עד לגרעין ובו פקטורי שעתוק המשפיעים על ייצור חלבונים אחרים.

חומצות אמיניות- אבני היסוד של החלבונים.

מבנה החומצה האמינית:

פחמן אלפא מרכזי ואליו קשורים ב**קשר קוולנטי**:

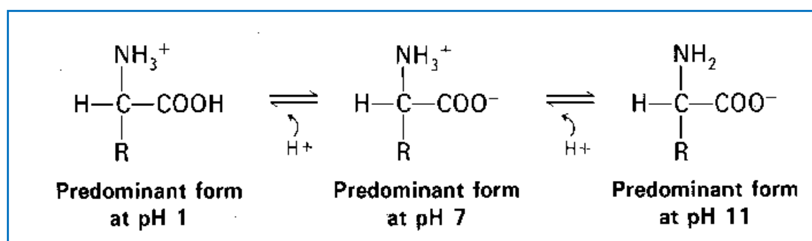
1. מימן.
2. קבוצת אמינו.
3. קבוצה קרבוקסילית.
4. קבוצת R המשתנה בין החומצות השונות- קבוצת הצד של כל חומצה אמינית, היא המבדילה בין 20 החומצות השונות הקיימות.

התיוננות: רכישת או איבוד מימן וכתוצאה מכך שינוי המטען החשמלי של החומצה האמינית.

בקבוצה האמינית, רכישת מימן תגרום לקבלת מטען חיובי: $NH_2 \rightarrow NH_3^+$.

בקבוצה הקרבוקסילית, איבוד מימן גורם למטען שלילי: $COOH \rightarrow COO^-$.

ההתיוננות של חומצה אמינית תלויית pH, ולכן קיימת תלות בין המטען החשמלי לבין רמת ה-pH שבה החומצה האמינית נמצאת. לדוגמא, כפי שניתן לראות בשרטוט למטה, ב-pH 7 הקבוצה הקרבוקסילית טעונה שלילית ואילו הקבוצה האמינית טעונה חיובית.



הפחמן הוא מרכז כיראלי ולכן יש שתי קונפורמציות: L ו-D.

בחלבונים כל חומצות האמינו נמצאות ב**קונפורמציית L**.

חלוקת חומצות האמינו לקבוצות שונות ע"פ אופי קבוצת ה-R:

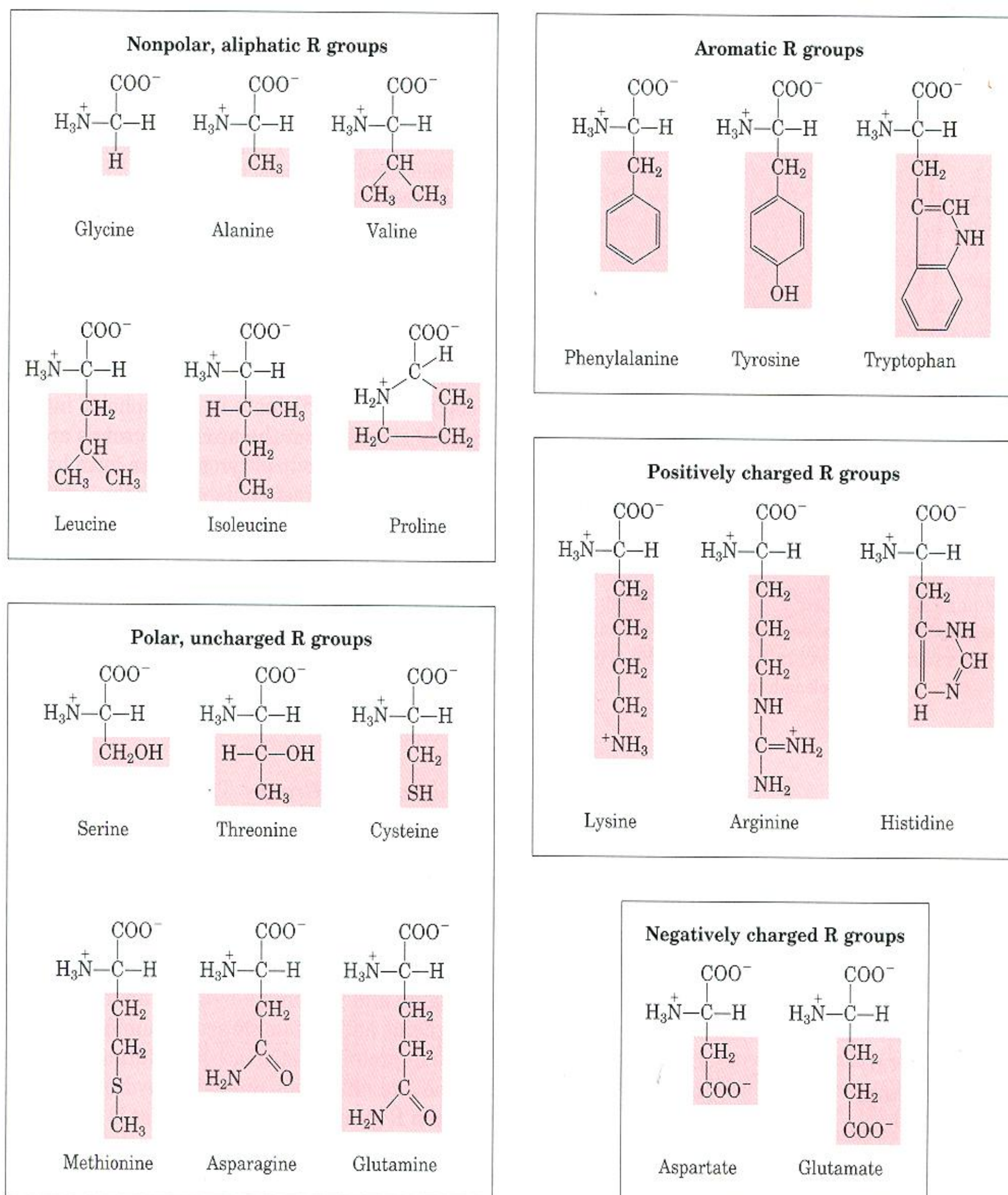
1. חומצות אמינו אליפתיות (הידרופוביות), לא פולריות- חומצות אמינו בעלות שרשראות פחמן בקבוצת הצד. אליהן משתייכת ה**גליצין** שקבוצת הצד שלה היא מימן- **החומצה האמינית הקטנה ביותר**. ככל

שקבוצת הצד ארוכה יותר, החומצה האמינית יותר הידרופובית ויותר נוטה לאינטראקציות הידרופוביות.

2. <u>חומצות אמינו ארומטיות-</u> בעלות טבעת בנזנית בקבוצת הצד. הידרופוביות, יוצרות אינטראקציות הידרופוביות אחת עם השנייה. למרות שהן הידרופוביות **לטירוזין יש פולריות** מסויימת בגלל **קבוצת ה-OH** שלה.
3. <u>חומצות אמינו פולריות, לא טעונות במטען חשמלי ב-pH ניטרלי-</u> בעלות OH, SH או CO בקבוצת הצד. יכולות ליצור קשרי מימן ולכן פולריות, לא הידרופוביות.
4. <u>חומצות אמינו פולריות, טעונות במטען חשמלי ב-pH ניטרלי:</u>

טעונות חיובית: ליזין, ארגינין, היסטידין (טיפה פחות טעונה ב-pH פיזיולוגי).

טעונות שלילית: אספרטט וגלוטמט, שתיהן בעלות קבוצת -COO ב-pH=7.



<u>חומצות אמינו מיוחדות</u>

1. <u>ציסטאין</u>- בעלת קבוצת צד SH.
2. <u>גליצין</u>- בעלת קבוצת צד H. החומצה האמינית הקטנה ביותר, בגלל גודלה נמצאת באזורים מסויימים של החלבון לדוגמא בקיפולים.
3. <u>פרולין</u>- קבוצת הצד שלה היא שרשרת אליפתית שאינה קשורה רק לפחמן אלפא אלא גם לקבוצת האמינו בקשר קוולנטי וכך יוצרת מבנה של טבעת. הטבעת אינה מאפשרת את סיבוב הקשר הקוולנטי סביב פחמן אלפא, בכך משפיעה פרולין על מבנה החלבון בו היא נמצאת.

<u>ציסטאין</u>

1. **קבוצת הצד מתיינת**- ב-pH 8.3 (pH גבוה יחסית) יש איבוד של המימן **ומ-SH מתקבל** S^-.
2. יותר חשוב- **שתי חומצות אמינו מסוג ציסטאין יכולות ליצור קשר דיסולפידי קוולנטי** האחת עם השנייה, זהו הקשר הקוולנטי היחיד שנוצר בין חומצות אמינו שהוא לא הקשר הפפטידי. שתי חומצות אמינו הנמצאות רחוק אחת מהשנייה בשרשרת החלבון יכולות ליצור קשר קוולנטי ביניהן. יצירת הקשר הדיסולפידי הוא תהליך <u>חמצון- יציאת שני מימנים</u>.

<u>חומצות האמינו הארומטיות</u>

קבוצות הצד הארומטיות בעלות תכונה של **בליעת אור באורך גל של 280 ננומטר** (קרוב לאזור האולטרא-סגול, UV) תכונה זו **מנוצלת לקביעת ריכוז חלבונים**:

לכל חלבון יש מספר מסויים של חומצות אמינו ארומטיות, ככל שריכוז החלבון גבוה יותר בתמיסה, כך בליעת האור גבוהה יותר ולכן ניתן להסיק לגבי ריכוז החלבון בתמיסה.

<u>מודיפיקציות שחומצות האמינו יכולות לעבור לאחר תרגומן</u>

לאחר סינטוזן לשרשרת פוליפפטידית בסיסית, ל-20 חומצות האמינו ישנה רמה נוספת של ואריאביליות:

1. השינוי העיקרי הוא **זרחון**- הוספה של זרחן, P, לשלוש חומצות אמינו בעלות קבוצת OH:
   - סרין.
   - טריאונין.
   - טירוזין.

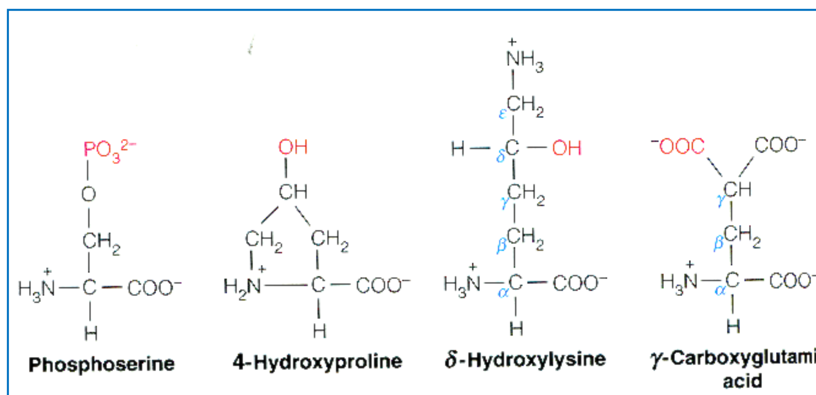
   הזרחון גורם ליציאת H והוספת PO_3^{2-} במקומו. כלומר, מוסיף שני מטענים שליליים לקבוצת הצד. לדוגמא, סרין הופכת מחומצה אמינית בעלת קבוצת צד ניטרלית לחומצה אמינית בעלת שני מטענים שליליים ונקראת פוספוסרין.

   זרחון היא רמה חשובה של בקרה על פעילות ומבנה חלבונים.
2. **הידרוקסילציה**- הוספה של קבוצת OH לפחמן מספר 4 של פרולין. לדוגמא בקולגן.

3. **קרבוקסילציה**- <u>גלוטמיק אסיד-</u> בדר"כ בעלת קבוצת COO^- ולאחר קרבוקסילציה בעלת שתי קבוצות COO^- ולכן בעלת שני מטענים שליליים במקום אחד. קרבוקסילציה מתרחשת באופן ספציפי על החומצה האמינית גלוטמט, לדוגמא בחלבון טרומבין הקשור לתהליך קרישת הדם.

שינויים נוספים כמו:

4. אצטילציה.
5. הוספת שיירי סוכר.



<u>עקומת טיטרציה</u>

חומצות אמינו מכילות קבוצות שיכולות לעבור יינון. לכל חומצה אמינית יש לפחות שתי קבוצות קבועות שיכולות לעבור יינון על ידי קבלת או שחרור מימן והן: NH_3^+, COO^-. בנוסף לכך, יש חומצות אמינו מסויימות שלהן קבוצות מתיינות בתוך קבוצת הצד. קבוצה שהיא חומצה- משחררת H, קבוצה שהיא בסיס- מקבלת H.

<u>pK</u>: **ה-pH שבו חצי מהקבוצה נמצאת במצב מיונן והחצי השני במצב לא מיונן** (הערך בו הקבוצה מתחילה לאבד את המימן שלה). מדד של נטיית קבוצה לאבד את המימן שלה. ספציפי לכל קבוצה ולכל חומצת אמינו.

pK של COOH נע באזור **2**.

pK של NH_3 הוא יותר גבוה ונע באזור ה- **9-10**.

היינו מצפים שכל קבוצות NH3 וכל קבוצות COOH יהיו בעלות אותם ערכי pK אך אין זה כך, וההבדלים נובעים מהמבנה הכימי סביב הקבוצה, מהשפעת האטומים שמסביב.

כמו כן, יש חומצות אמינו בעלות קבוצות צד מתיינות, **לקבוצות הצד ערכי pK משלהן**. לדוגמא: ארגינין- חומצה אמינית בסיסית, מכילה קבוצת צד NH_2 שלה ערך pK=12.5, כלומר ב-pH=12.5 היא מאבדת את המימן שלה.

Name	Abbreviations	pK_a of α-COOH Group	pK_a of α-NH_3^+ Group	pK_a of Ionizing Side Chain[a]	Residue[b] Mass (daltons)	Occurrence[c] in Proteins (mol %)
Alanine	A, Ala	2.3	9.7	—	71.08	9.0
Arginine	R, Arg	2.2	9.0	12.5	156.20	4.7
Asparagine	N, Asn	2.0	8.8	—	114.11	4.4
Aspartic acid	D, Asp	2.1	9.8	3.9	115.09	5.5
Cysteine	C, Cys	1.8	10.8	8.3	103.14	2.8
Glutamine	Q, Gln	2.2	9.1	—	128.14	3.9
Glutamic acid	E, Glu	2.2	9.7	4.2	129.12	6.2
Glycine	G, Gly	2.3	9.6	—	57.06	7.5
Histidine	H, His	1.8	9.2	6.0	137.15	2.1
Isoleucine	I, Ile	2.4	9.7	—	113.17	4.6
Leucine	L, Leu	2.4	9.6	—	113.17	7.5
Lysine	K, Lys	2.2	9.0	10.0	128.18	7.0
Methionine	M, Met	2.3	9.2	—	131.21	1.7
Phenylalanine	F, Phe	1.8	9.1	—	147.18	3.5
Proline	P, Pro	2.0	10.6	—	97.12	4.6
Serine	S, Ser	2.2	9.2	—	87.08	7.1
Threonine	T, Thr	2.6	10.4	—	101.11	6.0
Tryptophan	W, Trp	2.4	9.4	—	186.21	1.1
Tyrosine	Y, Tyr	2.2	9.1	10.1	163.18	3.5
Valine	V, Val	2.3	9.6	—	99.14	6.9

<u>לחומצות אמינו שונות עקומות טיטרציה אופייניות</u>

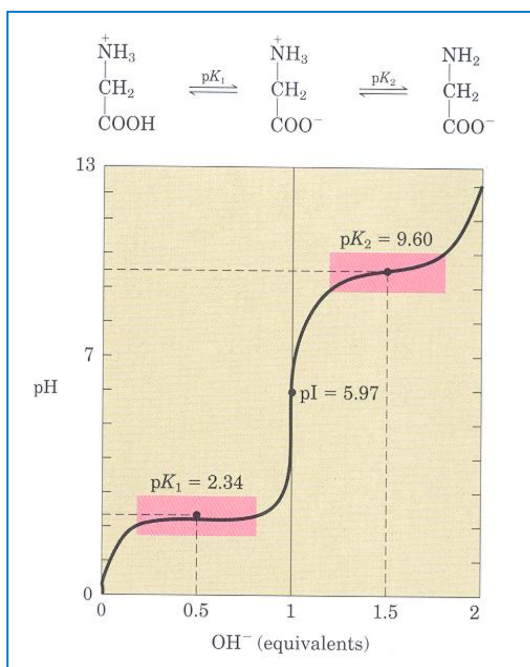
יצירת עקומת טיטרציה נעשית על ידי הוספה או הסרה הדרגתית של פרוטונים. שמים חומצה אמינית בתמיסה מאוד חומצית, pH=0, ומתחילים להוסיף יוני OH^- המעלים את pH. כאשר לוקחים תמיסה מימית ומוסיפים יוני OH^- מתקבלת עלייה לינארית ב-pH.

לעומת זאת, אם התמיסה מכילה חומצה אמינית גליצין אז מתקבלות שתי דבשות:

דבשת ראשונה באזור pH=2.34: קבוצת COOH מתחילה לאבד מימנים ← היא מטרלת את יוני OH המוספים (מתקבלות מולקולות מים) ← ולכן pH אינו משתנה (מתנהגת כבופר) ← לאחר שכל קבוצות ה-COOH התיוננו (בעוד אנו ממשיכים להוסיף יוני OH) ה-pH ממשיך לעלות.

דבשת שנייה באזור pH=9.6: הקבוצה האמינית מתחילה לאבד את המימן שלה וה-pH שוב מפסיק לעלות.

הנקודה האמצעית היא **הנקודה האיזואלקטרית** PI=5.97, הנקודה שבה **המטען נטו של חומצה אמינית שווה 0**, נקודה זו היא הממוצע בין שני ערכי ה- pK. בנקודה האיזואלקטרית החומצה האמינית לא תנוע תחת השפעתו של שדה חשמלי.

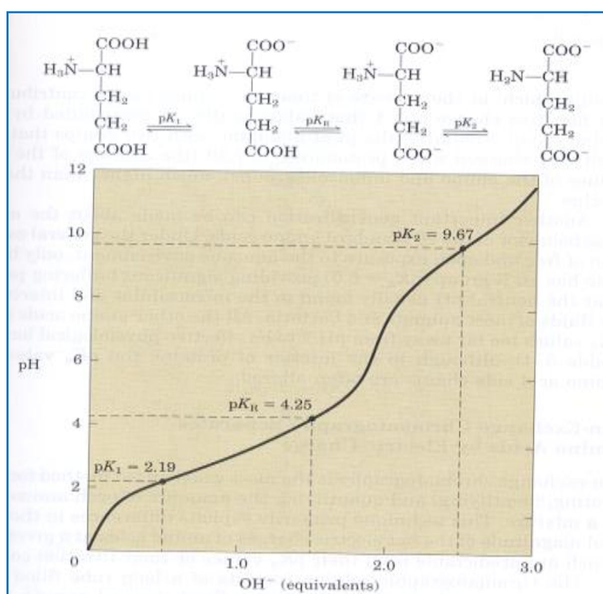


דוגמא נוספת:

עקומת הטיטרציה של גלוטמט- מכילה קבוצת צד בעלת COOH ולכן יכולה להתיונן ולשאת מטען שלילי.

דבשת ראשונה: הקבוצה הקרבוקסילית של פחמן אלפא מתחילה לאבד את המימן שלה.

דבשת שנייה: קבוצת COOH של קבוצת הצד מאבדת את המימן שלה.



דבשת שלישית: הקבוצה האמינית מאבדת את המימן שלה והופכת מ-NH_3^+ ל-NH_2 (מאבדת את המטען החיובי שלה).

ניתן לראות כי המולקולה משנה את מטענה בהדרגתיות כתלות ב-pH.

מהי הנקודה האיזואלקטרית של גלוטמט? הממוצע בין ה-pK הראשון לשני, בנקודה זו קבוצת COOH של פחמן אלפא התיוננה וקבוצת COOH השנייה עדיין לא התיוננה וכך מתקבלים מינוס של -COO ופלוס של ה-+NH3 ← המטען נטו הוא אפס.

- בחומצה אמינית בסיסית (לדוגמא היסטידין) הנקודה האיזואלקטרית תהיה בין ערכי pK של שתי הקבוצות האמיניות (הקבוצה האמינית של פחמן אלפא והקבוצה האמינית השייכת לקבוצת הצד).

<u>המטען החשמלי של חומצות אמינו וחלבונים</u>

לדוגמא: **גלוטמט**

pH=1: מטען המולקולה הוא 1+ שמקורו ב-NH_3^+.

pH=3.25: המולקולה מכילה מטען שלילי אחד ומטען חיובי אחד ← והמטען נטו הוא אפס ← זוהי הנקודה האיזואלקטרית של המולקולה.

pH=7: שתי הקבוצות הקרבוקסיליות התיוננו ולכן המטען הכולל הוא 1-.

pH=12: החומצה האמינית איבדה את המטען החיובי שלה ולכן המטען נטו הוא 2-.

Point	Charged Form	Charge
A (pH 1)	$COOH$ CH_2 CH_2 $NH_3^+—CH—COOH$	+1
B (pH 3.25)	$COOH$ CH_2 CH_2 $NH_3^+—CH—COO^-$	0
C (pH 7)	COO^- CH_2 CH_2 $NH_3^+—CH—COO^-$	−1
D (pH 12)	COO^- CH_2 CH_2 $NH_2—CH—COO^-$	−2

- אם אנחנו ב-pH=4.2 שהוא בדיוק ה-pK של הקבוצה הקרבוקסילית העליונה (זו השייכת לקבוצת הצד) אז אנחנו צריכים לחשב כאילו יש עליה מטען של 0.5-.
- הקבוצות היוצרות את הקשר הפפטידי אינן מתיוננות, הקשר הפפטידי מבטל את ההתיוננות שלהן. רק קבוצות חופשיות, כלומר, הקבוצה האמינית החופשית בקצה ה-N והקבוצה הקרבוקסילית החופשית בקצה ה-C, יכולות להיות מיוננות, כל השאר נמצאות בקשרים פפטידים.

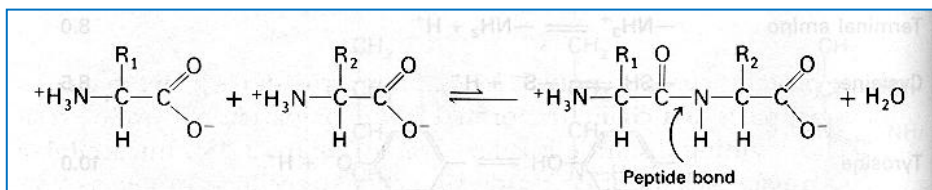
NH_3^+ (on Lys), COO^- (on Glu)

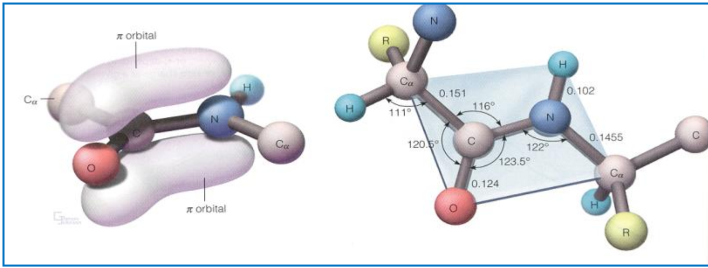
$^+NH_3—Lys—Gly—Ala—Glu—COO^-$

מה המטען של המולקולה שבצד שמאל, ב-pH=6?
הפפטיד מכיל שני מטענים חיוביים ושני מטענים שליליים ולכן המטען נטו הוא 0. אנו יכולים להסיק כי pH=6 הוא נמוך מה-pK של שתי הקבוצות האמיניות ולכן הן טעונות חיובית ואילו גבוה מה-pK של הקבוצות הקרבוקסיליות ולכן הן טעונות שלילית.

<u>הקשר הפפטידי</u>

הקשר הפפטידי **נוצר** בין שתי חומצות אמינו, **בין קבוצה קרבוקסילית של חומצת אמינו אחת לקבוצה אמינית של חומצת אמינו אחרת** וביצירתו **יוצאת מולקולת מים**. כלומר, קשר בין פחמן לחנקן, הוא המאפשר את יצירת השרשרת של הפוליפפטיד. הקשר הפפטידי אינו נוצר באופן ספונטני, הוא נוצר על גבי הריבוזום תוכ"ד השקעת אנרגיה.



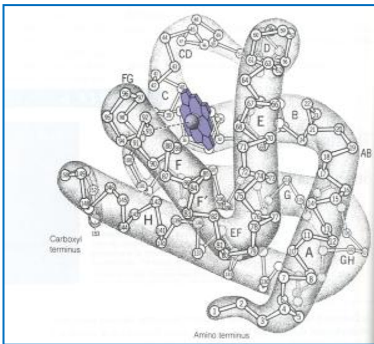


ישנה כיווניות לשרשרת:

קצה אחד הוא קצה N טרמינלי ובו קבוצה אמינית שאינה משתתפת בקשר, וקצה שני, הקצה ה-C-טרמינלי ובו קבוצה קרבוקסילית שאינה משתתפת בקשר.

אמינו- תחילת השרשרת. קרבוקסילי- סוף השרשרת.

ליד הקשר הפפטידי יש קשר כפול בין C ל-O וממנו יש מעבר אלקטרונים אל הקשר בין C ל-N, זהו מצב של שיווי משקל ולכן **הקשר הפפטידי הוא קשר כפול חלקי**, עובדה המקנה לו **קשיחות**. קשר יחיד הוא בעל יכולת סיבוב של האטומים סביב הקשר אבל **הקשר הפפטידי הוא קשר פלנרי וקשיח: האטומים C ו-N אינם יכולים להסתובב ויוצרים מישור.** סביב פחמן אלפא שהוא הפחמן המרכזי של כל חומצה אמינית יש סיבוב חופשי. פחמני אלפא יכולים להיות במצב טרנס או במצב ציס סביב הקשר הפפטידי. **בחלבון פחמני אלפא תמיד במצב טרנס** משום שמצב זה בעל עדיפות מבחינת המבנה המרחבי.



<u>המבנה המרחבי של מיוגלובין</u>

מיוגלובין הוא חלבון הליקלי הנושא מולקולות חמצן בתוך השריר. קשירת החמצן נעשית ע"י קשירה לקבוצת heme הפלנרית. מיוגלובין בנוי משרשרת פוליפפטידית אחת המכילה אזורים אלפא הליקליים.

כל המבנה המרחבי של מיוגלובין מתאפשר הודות לסיבוב סביב פחמני אלפא.

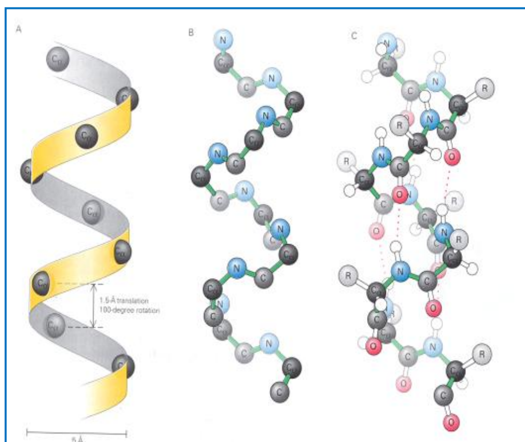
<u>חלוקת מבנה חלבון ל-4 רמות</u>

1. <u>מבנה ראשוני-</u> **רצף חומצות האמינו בשרשרת** והקשרים הקוולנטיים ביניהן וכן מיקום **הקשרים הדיסולפידיים** בין שני ציסטאינים.
2. <u>מבנה שניוני-</u> **מבנים רגילים** החוזרים על עצמם בכל חלבון- אלפא הליקס ובטא שיט. נוצרים **בין חומצות אמינו סמוכות אחת לשנייה** בתוך השרשרת. אלפא הליקס הוא מבנה מקומי הנוצר בין חומצות אמינו סמוכות.
3. <u>מבנה שלישוני-</u> מתאר את המבנה התלת מימדי של חלבון פשוט הבנוי משרשרת פוליפפטידית אחת. מתייחס **ליחסים המרחביים בין כל חומצות האמינו בחלבון**.
4. <u>מבנה רביעוני-</u> בחלבונים יותר מורכבים המורכבים מיותר משרשרת פוליפפטידית אחת- **היחס בין תת היחידות השונות של החלבון**.

- לא ניתן לחזות את המבנה המרחבי של חלבון לפי רצף חומצות האמינו.

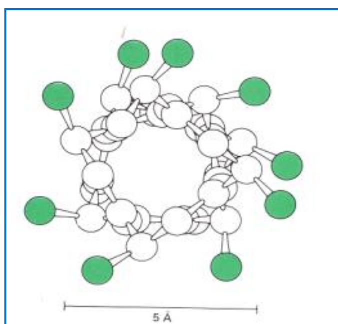
<u>יציבות המבנה המרחבי של החלבון</u>

יציבות החלבון שולית, אנו יודעים שאם מעלים את הטמפ' רק בכמה מעלות חלבונים עוברים דה-נטורציה (שבירת מבנה החלבון). **מבנה החלבון מיוצב בעיקר על ידי קשרים חלשים**: קשרי מימן, ו.ד.ו, הידרופוביים, קשרים יונים, יש מאות קשרים כאלה בחלבון. הסיבה ליציבות הזו היא עלייה באנטרופיה של מולקולות מים: על כל קשר חלש שנוצר בתוך החלבון, נשבר קשר עם מים ← **עלייה באנטרופיה** ובתנועה החופשית **של מולקולות מים היא התורמת ליציבות החלבון**.



אלפא הליקס

- מיוצב על ידי קשרי מימן בין H של קבוצת NH ו-O של קבוצת CO של השרשרת המרכזית. קשרי מימן נוצרים בין חומצה אמינית אחת לזו שמופיעה 4 חומצות אחריה ברצף החומצות האמיניות (לדוגמא בין מספר 1 למספר 5). אינו יכול להיווצר בין חומצות אמינו סמוכות. **כל** הקבוצות הנ"ל על השרשרת המרכזית משתתפות ביצירת קשרי מימן.
- כל חומצה אמינית מסובבת ב-100 מעלות ביחס לחומצה האמינית הסמוכה לה, כלומר יש 3.6 חומצות אמינו בכל סיבוב של האלפא הליקס (סיבוב של 360 מעלות).
- קשרי המימן מקבילים לציר ההליקס.



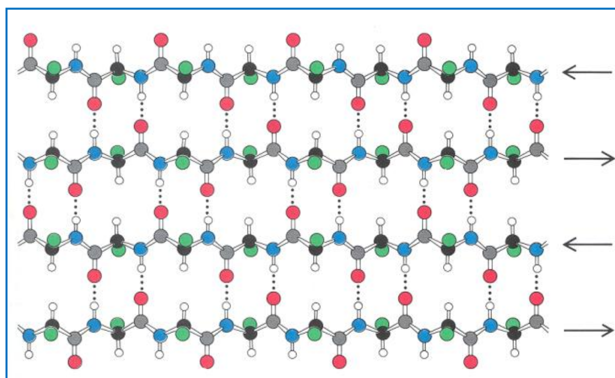
- קבוצות הצד של כל חומצה אמינית פונות החוצה מההליקס ולכן יכולות להשפיע על יציבות המבנה (מסומנות בצבע כהה).
- למבנה ההליקס יש כיווניות:
  - הליקס שמאלי.
  - הליקס ימני.

בטבע כל ההליקסים הם **ימניים**.

<u>כיצד חומצות אמינו ספציפיות באלפא הליקס משפיעות על יציבות המבנה?</u>

- **חומצות אמינו סמוכות אחת לשנייה בשרשרת:**
  1. קבוצות אמינו שקבוצת הצד שלהן גדולה והן נמצאות סמוך אחת לשנייה הורסות את היציבות בגלל הפרעה מרחבית.
  2. קבוצות צד בעלות מטען חשמלי זהה הסמוכות אחת לשנייה יוצרות דחייה חשמלית והמבנה יכול להישבר.
- **חומצות אמינו הנמצאות במרחק של 3-4 חומצות אחת מהשנייה** (=נמצאות אחת מעל השנייה):
  1. חומצה אמינית אחת בעל קבוצת צד הידרופובית ומעליה קבוצה נוספת עם קבוצה הידרופובית זה יכול לגרום לאינטראקציות הידרופוביות המייצבות את מבנה ההליקס.
  2. מטענים חשמליים הפוכים- חומצה אמינית טעונה חיובית ו-4 מעליה חומצה אמינית טעונה שלילית, יוצרות קשרים יוניים אחת עם השנייה ומייצבות את המבנה.
- **פרולין-** המולקולה מכילה בתוכה **קשר קשיח** בין פחמן אלפא לחנקן ולכן **פרולין לא יכולה להיות בתוך אלפא הליקס**, פרולין שוברת את מבנה האלפא הליקס ולכן תמיד תופיע בסוף מבנה האלפא הליקס.
- **השפעת קשרי מימן ודיפולים חשמליים על יציבות המבנה:**
  NH יוצר דיפול חשמלי חיובי, CO דיפול חשמלי שלילי. כאשר נוצר קשר מימן הדיפולים החשמליים מבטלים זה את זה. 4 חומצות האמינו הקיצוניות בכל צד של שרשרת הפוליפפטיד אינן משתתפות ביצירת קשרי מימן ולכן בתחילת האלפא הליקס מספר מטענים חיוביים של NH ובסוף האלפא הליקס מספר מטענים שליליים של CO. ולכן חומצות אמינו חומציות (טעונות שלילית) מייצבות את הקצה ה-N טרמינלי ואילו חומצות אמינו בסיסיות (טעונות חיובית) מייצבות את הקצה ה-C טרמינלי, על ידי ביטול המטען העודף הנוצר מהדיפול החשמלי.

בטא שיט



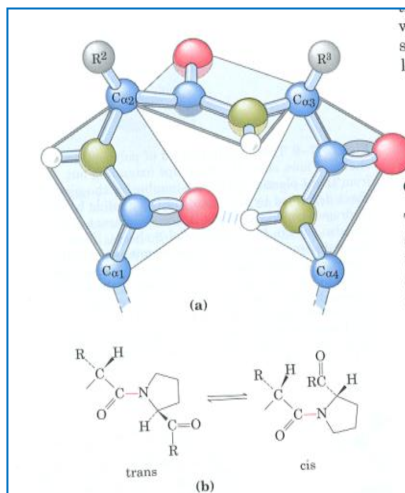
ההבדל בינו לבין האלפא הליקס הוא שהמרחק בין האטומים בבטא שיט גדול יותר.
גם במבנה זה נוצרים קשרי מימן המייצבים את המבנה בין NH ל-CO, אך הם אינם נוצרים במרחק קבוע כמו באלפא הליקס אלא במרחקים משתנים: בין שרשראות פוליפפטידיות שונות או בתוך השרשרת של אותו חלבון שמתקפל על עצמו.
שתי אפשרויות לסוג המבנה:

- מבנה אנטי פרללי- השרשרת משנה את הכיוון שלה בכל פעם.
- פרללי- שתי שרשראות שהכיווניות שלהן זהה (מבחינת 5 ל-3).

מבנה בטא בניגוד לאלפא יכול להיווצר גם בין שתי שרשראות פוליפפטידיות שונות (אלפא רק בתוך אותה שרשרת).
קבוצות הצד R של שתי חומצות אמינו סמוכות פונות לכיוונים מנוגדים- למעלה או למטה מהמישור.

על מנת לאפשר את מבני האלפא הליקס והבטא שיט השרשרת הפוליפפטידית עושה תפניות מאוד חדות וכתוצאה מכך מתקפלת וחוזרת על עצמה בכיוון ההפוך. זה מתרחש בין שני מבני בטא שיט אנטי פרלליים או בין שני אלפא הליקסים.

<u>כיצד השרשרת יוצרת תפנית חדה?</u>

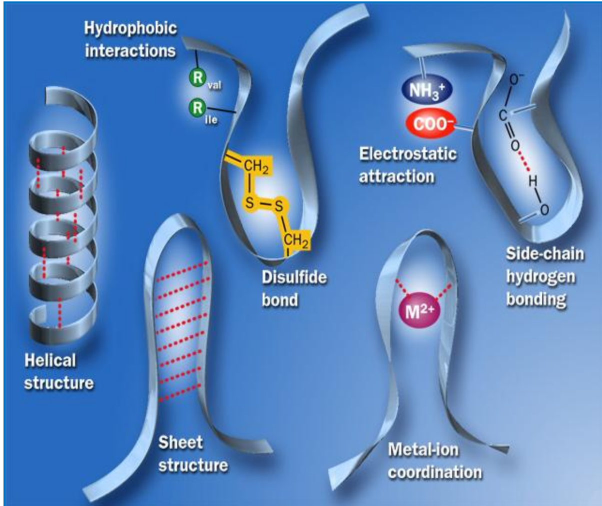


1. יצירת **גשר מימן** בין NH של חומצה אמינית אחת ל-CO של החומצה האמינית השלישית אחריה (מספר 4). נוצר קשר מימן יחיד (לעומת אלפא הליקס) בתפנית של 180 מעלות.
2. לעיתים קרובות נמצא בקיפול חומצה אמינית קטנה כמו **גליצין** המאפשרת סיבוב לגמרי חופשי סביב פחמן אלפא.
3. **פרולין-** כפי שכבר הוזכר, אינה יכולה להימצא באלפא הליקס כי היא בעלת קשר קשיח בין פחמן אלפא לחנקן בגלל קבוצת צד טבעתית המקשרת בין שניהם. הקשר הקשיח של פרולין המצומד לקשר הפפטידי שגם הוא קשיח מאפשרים יצירת אחת משתי קונפורמציות:
   1. טרנס.
   2. ציס- יוצר תפנית בשרשרת.

   פרולין במצב של ציס בהכרח יוצר תפנית בשרשרת.

מבנה שלישוני

מתאר את המבנה של חלבון המורכב מפוליפפטיד אחד, מכיל בתוכו כמה סוגים של מבנים שניוניים ואינטראקציות בין חומצות אמינו שאינן סמוכות במבנה הפוליפפטיד.
חלבונים גלובולריים הם חלבונים קומפקטיים הודות לסיבובים החדים בין האלפא הליקסים והבטא שיט המרכיבים אותם, לעומת חלבונים סטרוקטורליים- סיביים ומוארכים. חלבונים גלובולריים כוללים אנזימים, חלבוני טרנספורט, הורמונים ואימונו-גלובולינים. הקשרים המייצבים את המבנים השניוניים מייצבים גם את הקשרים של המבנה השלישוני, קשרים שאינם קוולנטיים הניתנים לפירוק בהשקעת אנרגיה נמוכה:



- קשרי מימן בתוך המבנים השניוניים ובין קבוצות הצד.
- אינטראקציות הידרופוביות.
- אינטראקציות חשמליות- בין מטענים חשמליים.
- מעורבות יוני מתכת שאינם קשורים לשרשרת המרכזית של הפוליפפטיד, נמצאים במקומות מסויימים בחלבונים ובגלל המטען שלהם הם מסדרים סביבם מספר חומצות אמינו הנמשכות אליהם וכך יוצרים מבנה מרחבי.
- קשר דיסולפידי- היחיד שהוא קוולנטי.

מאות אלפי קשרים מהסוגים הנ"ל ולמרות זאת המבנה המרחבי אינו יציב.

<u>מיוגלובין- חלבון במבנה שלישוני</u>

שרשרת חלבונית אחת המורכבת מ-153 חומצות אמינו.
נושא חמצן בשרירים, על ידי טבעת שאינה חלק מהשרשרת הפוליפפטידית, טבעת heme, שאינה חשופה למים ושקועה עמוק בתוך החלבון (חשוב למילוי תפקידה). החמצן נמצא במרכז הטבעת כאשר הוא קשור לאטום ברזל (Fe). שתי קבוצות צד של חומצות אמינו היסטידין המהוות חלק מהשרשרת של הפוליפפטיד משתתפות גם הן בקשירת החמצן.
8 שרשראות של אלפא הליקס (70% מהחלבון) וכל השאר תפניות בין השרשראות, 4 מהתפניות מכילות פרולין. לפעמים התפניות בעלות סיבוב חד, אבל לרוב השרשרת אינה מאורגנת במבנה מוגדר אלא במבנה גמיש שנע- irregular structure.
מיוגלובין הוא חלבון קומפקטי, אזורים שלמים ממנו נמצאים בתוך החלבון וכלל אינם חשופים למים.
כאשר החלבון מקופל ניתן לראות שכל חומצות האמינו ההידרופוביות מתרכזות במרכז החלבון ואינן חשופות למגע עם מים ואילו ההידרופיליות נמצאות בשולי החלבון באזורים חשופים למים (לאחר סימון החומצות ההידרופוביות וההידרופיליות בצבעים שונים).
הכוחות העיקריים המייצבים את מבנה החלבון הן האינטראקציות ההידרופוביות (אך גם באמצעות קשרי ו.ד.ו. וקשרי מימן).

<u>כיצד אנו קובעים את מבנה החלבונים?</u>

קריסטלוגרפיה: מגבשים את החלבון, ועל ידי הקרנה של קרני X על הגביש ניתן לזהות את מבנה האטומים (כתוצאה משבירה של הקרניים על ידי החלבון).

<u>ניסוי אנפינסן</u>

מטרה: להוכיח שרצף חומצות האמינו של הפוליפפטיד הוא הקובע את המבנה המרחבי של חלבון.
מהלך הניסוי:

1. לקח את חלבון ה-Ribonuclease (אנזים המפרק שרשראות RNA לנוקלאוטידים בודדים) המורכב מ- 124 חומצות אמינו, תת יחידה אחת. יש לו 4 קשרים דיסולפידיים בין שיירי ציסטאין.
2. עשה ל-Ribonuclease דנטורציה- הרס את המבנה הפעיל שלו:
   א. שבירת הקשרים הדיסולפידיים- על ידי beta mercaptoethanol, חומר המחזר את הקשרים הדיסולפידיים על ידי הוספת יוני מימן.
   ב. הוספת urea או guanidine hydrochloride- שוברים את כל הקשרים שאינם קוולנטים.

3. הרחקת המרכיבים הללו מהחלבון על ידי דיאליזה- מאפשר לחלבון להתקפל בחזרה.
אם החלבון רוכש את פעילותו בחזרה ב-100% זה אומר שכל החלבון התקפל בחזרה למבנה הפעיל, אם הוא רוכש רק 20% מהפעילות שלו אז רק 20% מהחלבונים התקפלו בחזרה למבנה הפעיל.

תוצאה: קיבל בחזרה 100% מפעילות החלבון.
מסקנה: כל האינפורמציה הדרושה לקביעת המבנה המרחבי של Ribonuclease נמצאת ברצף חומצות האמינו המרכיב אותו. זה לא נכון לגבי כל חלבון, במקרה הזה מדובר בחלבון פשוט, יש חלבונים יותר מורכבים שלא יוכלו להתקפל בצורה זו בחזרה למבנה הפעיל שלהם.

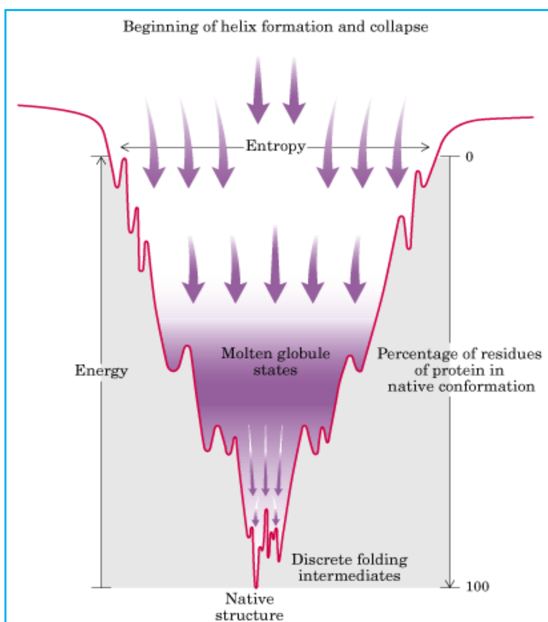
<u>ניסוי משלים:</u>
גרם ליצירת קשרים דיסולפידיים בנוכחות אוראה. אוראה מנטרלת את הקשרים המייצבים את מבנה החלבון ולכן קשרי SS שנוצרו היו שגויים. כאשר הרחיק גם את האוראה ובדק את פעילות החלבון הוא ראה שרק 1% חזר לפעילות אנזימתית.
יש 105 אפשרויות לקשרים דיסולפידיים במידה ואלה נוצרים באופן אקראי (ורק אפשרות אחת תביא לחלבון תקין), מבחינה סטטיסטית הצורה הנכונה של החלבון היא בערך 1% מכלל הצורות שיכולות להתקבל.

<u>ניסוי אחרון:</u>
לקח חלבון הנמצא במצב scrambled (לא המצב הנטיבי שלו) והוסיף כמות מזערית של beta mercaptoethanol, הוספתה מאפשרת שבירת הקשרים הדיסולפידיים והיווצרותם מחדש.
האם החלבון ישאף לקונפורמציה הנכונה?
אחרי עשר שעות בתוך תמיסה החלבון יצר את המבנה הנכון וקיבל בחזרה את פעילותו.
מסקנה: המבנה הנטיבי של החלבון יציב יותר מבחינה תרמודינמית לעומת מבנים אחרים. כלומר, קיימת שאיפה תרמודינמית להגיע למבנה בעל רמת האנרגיה הנמוכה ביותר.

<u>יש 2 מודלים שמסבירים כיצד חלבון במבחנה יכול להתקפל בצורה ספונטנית למבנה המרחבי הנכון שלו:</u>

1. **המודל ההדרגתי-** שרשרת פוליפפטידית במצב אקראי לגמרי תתקפל בצורה הדרגתית: קודם יווצרו מבנים שניוניים סמוכים והם יצרו את המבנה הגבוה יותר עד אשר כל החלבון מגיע למצב מקופל.
2. **מודל שמציע התקפלות בבת אחת-** מודל שונה לחלוטין שאינו מדבר על קיפולים מקומיים. החלבון מתקפל בבת אחת, מתמוטט לתוך מבנים קומפקטיים, המיוצבים על יד אינטראקציות הידרופוביות בין חומצות האמינו.
איך זה קורה?

<u>גרף משפך אנרגיה חופשית:</u>
החלבון במצב לא מקופל מתמוטט לתוך מבנה מסויים המיוצג על ידי נקודת מינימום מקומית המתארת את המצב האנרגטי של הפוליפפטיד. אם זה לא המצב הנכון השרשרת שוב תיפתח ושוב תתמוטט למבנה יותר יציב, כך חוזר חלילה עד שהחלבון מגיע למבנה הנטיבי שלו. ככל שיורדים בגרף דרגת האנטרופיה הולכת ויורדת, ככל שיורדים ברמת האנרגיה פחות מבנים יכולים להיווצר עד שמגיעים למבנה הנטיבי שהוא היציב ביותר ואין אפשרות למבנים נוספים.



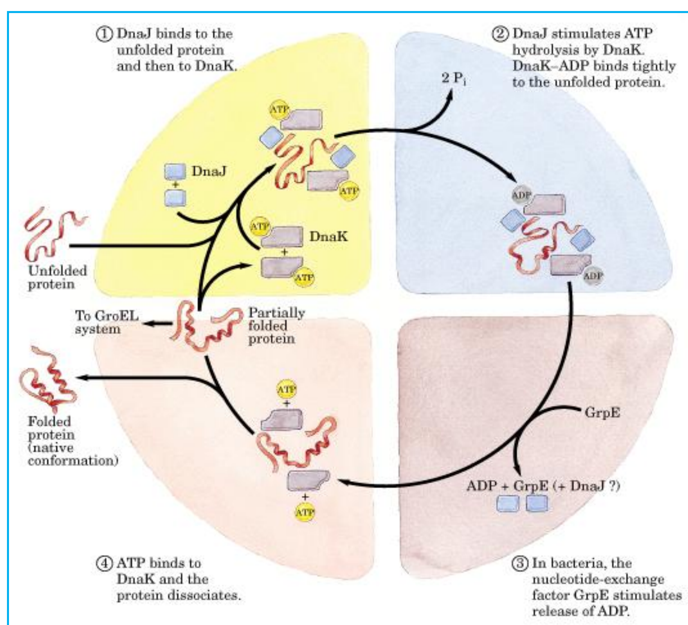
לא כל חלבון יכול להתקפל באופן ספונטני לצורה הנכונה. יש מנגונים בתוך התא המשתתפים בהתקפלות חלבונים:

1. Heat shock proteins- באופן נורמלי אינם מתבטאים אלא במצבי עקה. במצבי עקה חלבונים עוברים דנטורציה וזה יכול לגרום לאגרגציה של חלבונים שאינם מקופלים נכון ואז למוות התא: Hsp70, DnaJ, Dnak.
2. Chaperonins- GroEL/GroES מתבטאים במצב פיזיולוגי, כאשר החלבון יוצא מהריבוזום.
3. אנזימים- Protein disulfide isomerases (PDI)- משתתף ביצירת קשרי ה-SS הנכונים.
4. Peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPI)- האנזים גורם לכך שברוב המקרים החלבון יהיה במצב של טרנס (בעיקר בחומצות אמינו מסוג פרולין).

Heat shock proteins

ספציפיים למצבי עקה.

לכל אחד מהם קשורה יחידת ATP. נקשרים לחלבונים שעברו דנטורציה←הידרוליזה של ATP ← תת יחידה הקשורה ל-ADP ← הקישור של HSP לחלבון הדנטורטיבי יותר חזק והוא משפיע על קיפולו, גם באמצעות האנרגיה שהשתחררה בהידרוליזה ← החלפה של ADP ב-ATP ← החלבון משתחרר כי מקופל מספיק או שהוא עובר סייקל נוסף של התהליך. המערכת היא סוג של עזרה ראשונה, שגורמת לחלבון להגיע למצב בו הוא יכול להיות סובסטרט של המערכת הבאה:

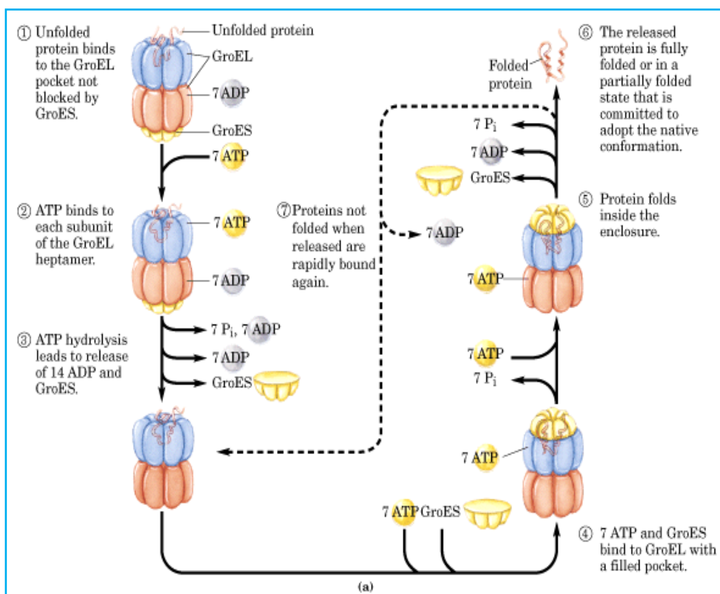


Chperonins- GroEL/ES

שתי טבעות של חלבונים שכל אחת מהן מורכבת מ-7 חלבונים ומכסה. חלבון לא מקופל מוחדר פנימה לתוך ה"חבית"← קישור של ATP לכל תת יחידה ← קישור של יחידות הנקראות GroES- מכסה הסוגר מלמעלה את כל החבית ← הידרוליזה ← קיפול חלבון לתקין.

הקיפול של החלבון נעשה הודות ל:

1. שינוי קונפורמטיבי של החלבון בפנים בכל קישור ופריקה של ATP.
2. תנועתיות בתוך החבית בעקבות ההידרוליזה תורמת לקיפול החלבון.
3. אינטראקציות הידרופוביות בין חומצות אמינו פנימיות של המבנה עם חומצות אמינו של הפוליפפטיד המתקפל.
4. כל הסביבה הפנימית היא סביבה הידרופובית המנותקת מהסביבה החיצונית ומאפשרת לחלבון להתקפל.

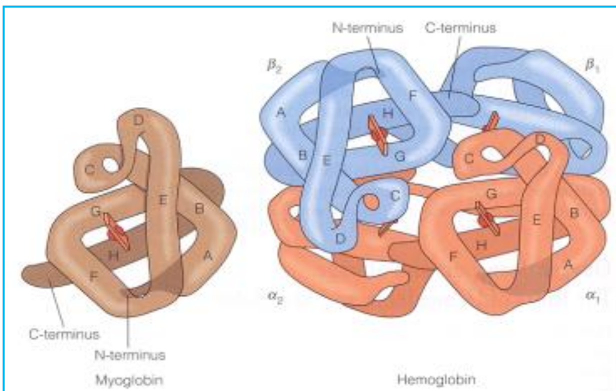


גם תהליך זה הוא תהליך ציקלי- אם זה הצליח אחרי סיבוב אחד החלבון משתחרר החוצה, אם זה לא היה מספיק- החלבון נכנס שוב למבנה כזה והכל מתחיל מחדש.

מבנה רביעוני

מתאר את התארגנות תת היחידות של החלבון לקומפלקס תלת מימדי. קיים רק בחלבונים שיש להם יותר מתת יחידה אחת (המוגלובין, RNA פולימראז). לעיתים נמצא עד עשרות שרשראות פוליפפטידיות יחד. המבנה המרחבי מיוצב על ידי אותם קשרים המייצבים את המבנה השלישוני והשניוני: קשרי מימן ואינטראקציות הידרופוביות מייצבים את הקשר בין תת היחידות השונות, לפעמים גם קשרים דיסולפידיים.

המוגלובין- חלבון במבנה רביעוני:

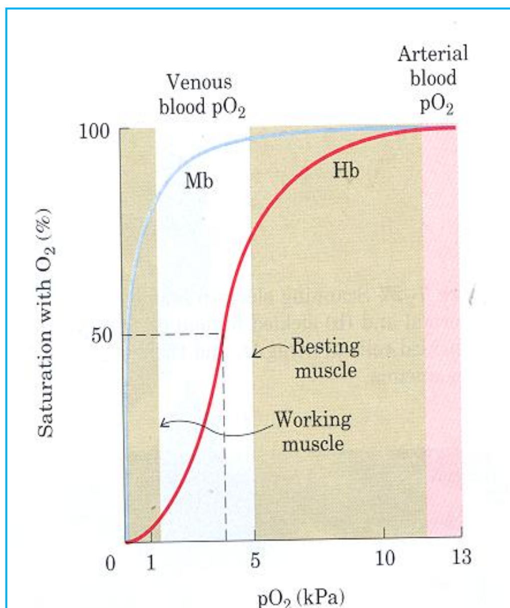


מורכב מארבע תת יחידות: 2 תת יחידות אלפא ו-2 תת יחידות בטא שהן דומות אך לא זהות. יש נקודות מגע רבות בין יחידות אלפא לבטא, רובן בעלות אופי הידרופובי. בתוך כל תת יחידה כזו יש טבעת heme המיוצבת לשרשרת הפוליפפטידית על ידי כל מיני אינטראקציות. כל יחידת heme מכילה ברזל ואחראית לקשירת אטום חמצן. אם לוקחים תת יחידה אחת של המוגלובין ומשווים אותה למיוגלובין רואים את הדמיון מבחינת הקיפול (בין שני החלבונים המבצעים את אותה פונקציה).

Sickle cell anemia- אנמיה חרמשית.

יש כ-300 ואריאציות גנטיות ידועות בחומצות האמינו המרכיבות את חלבון ההמוגלובין. רבות מהן בעלות השפעה מינורית על מבנה או תפקוד החלבון. לתופעה כזו קוראים פולימורפיזם- החלבונים שלנו אינם זהים, כל אחד שונה במעט במולקולות אך זה לא משפיע על פעילותו. לעומת זאת מוטציה היא שינוי המשפיע על הפעילות ובדר״כ גורם למחלה. במוטציה המתרחשת באנמיה חרמשית: גלוטמט (נושאת מטען שלילי) בעמדה 6 בתת היחידה בטא מוחלפת בולין (הידרופובית). זהו שינוי שאינו קונסרבטיבי- משנה את אופי החומצה האמינית לחלוטין. השינוי גורם להיווצרות דביקות הידרופובית בין תת היחידות בטא, כך שבריכוזי חמצן נמוכים תת היחידות יוצרות שרשראות ארוכות של מולקולות המוגלובין, ומכאן צורתו המוארכת והחרמשית של תא הדם. תאים אלה רגישים מאוד, עד כדי פיצוץ כדורית הדם האדומה ←המוליזה ואנמיה. זו דוגמא לכך ששינוי בחומצה אמינית אחת בלבד גורם לשינוי באינטראקציות בין תת היחידות ולמחלה.

מהו ההבדל בין מיוגלובין להמוגלובין?



עקומת סטורציה- עקומה המציגה את רמת הקישור של כל אחד מהחלבונים הללו לחמצן בריכוזי חמצן שונים.
מיוגלובין- בהיר (תכלת). המוגלובין- כהה (אדום).
התנהגות החלבונים שונה לחלוטין:
בריכוזים נמוכים של חמצן, מיוגלובין נמצא במצב של 100% קישור, כל האתרים של מיוגלובין קשורים לחמצן. לעומת זאת המוגלובין אינו קושר הרבה חמצן. ככל שריכוז החמצן עולה, יש שינוי בשיפוע העקומה של המוגלובין. קיים סף ממנו כל שינוי קטן בריכוז החמצן גורם לקשירת חמצן ביעילות גבוהה יותר.

מדוע זה ככה?
חלבון בעל תת יחידה אחת (מיוגלובין) נמצא בקונפורמציה של אפיניות גבוהה לחמצן וזקוק לריכוזים קטנים של חמצן על מנת לקשור אותו. חלבון שלו ארבע תת יחידות (המוגלובין) משנה את האפיניות שלו לחמצן כתלות בריכוז החמצן: בריכוזי חמצן נמוכים אינו קושר חמצן ביעילות (אפיניות נמוכה), ככל שריכוזי החמצן עולים, האפיניות של החלבון עולה.
זה נובע משינויים מבניים בתת היחידות: הקישור לתת היחידה הראשונה של המוגלובין הוא קישור באפיניות נמוכה, 4 תת היחידות נמצאות בקונפורמציה שהיא בעלת אפיניות נמוכה לחמצן. הקישור של מולקולות חמצן אחת משנה את המבנה המרחבי של החלבון (פירוק קשרים יוניים בין תתי היחידות), נוצרים שינויים מבניים בשאר תת היחידות והחלבון עובר ממצב של אפיניות נמוכה לאפיניות גבוהה: טבעות ה-heme מתרחקות אחת מהשנייה וכך יכולות להיקשר לחמצן (כך שהקישור לחמצן בתת היחידות השנייה, השלישית והרביעית נעשה באפיניות גבוהה יותר). המבנה הזה משרת את המטרות שלנו בגוף: אנו רוצים שהמוגלובין יקשור חמצן בצורה יעילה בדם (שם הריכוז גבוה), וישחרר את החמצן כאשר הוא מגיע לרקמות- שהוא אזור דל בחמצן.
(Deoxyhemoglobin\oxyhemoglobin- מצב שבו ההמוגלובין קשור או לא קשור לחמצן).

Exploring Proteins

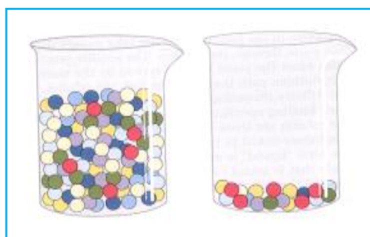
ניקוי חלבון המצוי בכמות קטנה בתוך תערובת חומרים נעשה במספר שיטות ובאופן הדרגתי ואמפירי. אם אנחנו רוצים לנקות חלבון, אנחנו חייבים לדעת משהו על הפעילות הקטליטית שלו ולדעת למדוד אותה. מבחן ביולוגי- biological assay- הפעילות הקטליטית של אנזים יכולה להימדד אם יודעים:
א. משוואת הריאקציה.
ב. תהליך שבו נבחן את קצב היעלמות המגיב והיווצרות התוצר.
ג. תנאי התגובה (pH, טמפ', מלח).

Table 6–4 A purification table for a hypothetical enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

* All data represent the status of the sample *after* the procedure indicated in the first column has been carried out.

הגדרות:
1. **One unit of enzyme activity-** כמות האנזים שגרמה לטרנספורמציה של 1 מיקרומול סובסטרט בדקה ב-25 מעלות.
2. **activity**- כמות היחידות הכוללת של אנזים בתמיסה.
3. פעילות ספציפית **specific activity**- כמות יחידות פעילות של האנזים שיש במ"ג תערובת חלבונים (יחס בין יחידות פעילות למ"ג). מתאר כמה יחידות פעילות של האנזים יש בכלל התמיסה.

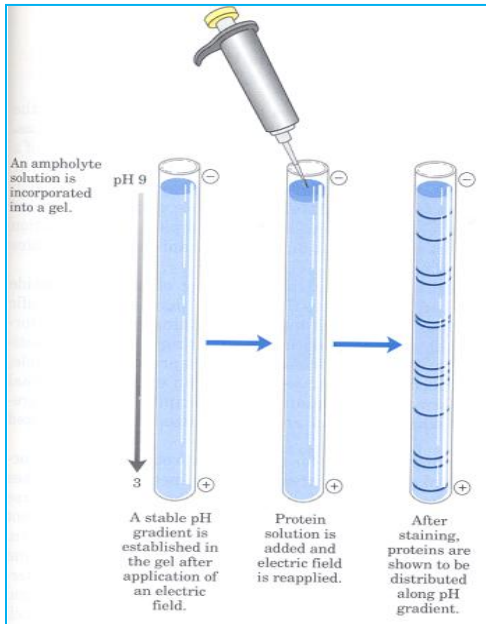


בכל שלב של ניקוי החלבון נמדוד את הפעילות הספציפית, אנחנו מצפים, שבכל שלב הפעילות הספציפית תעלה, כמות החלבון הכללי תרד וכמות יחידות הפעילות תישארנה זהה (תקטן כמה שפחות). אם הפעילות הספציפית לא עלתה אחרי שלב מסויים של ניקוי או אפילו ירדה זה אומר שהשלב הזה לא היה יעיל. התמונה בצד ממחישה את ההבדל בין פעילות ספציפית גבוהה לנמוכה. בשני המקרים יש אותה כמות גולות אדומות (אותה פעילות), אך בימנית יש אחוז גבוה ממנה ביחס לשאר התמיסה (פעילות ספציפית גבוהה יותר).
בטבלה למעלה ניתן לראות העשרה של פי 1500 מתחילת התהליך ועד סופו.

איך ניתן לדעת שהתמיסה מכילה חלבון נקי ואין חלבונים מזהמים?
שיטה אחת היא להשתמש בשיטת ניקוי נוספת- אם לא נצליח להעשיר את החלבון שלנו יותר, זה סימן שכנראה הגענו למצב של ניקיון גבוה. ניתן לקבוע רמת ניקיון בצורה הטובה ביותר על ידי הרצה על ג'יל- בתמיסה נקייה נקבל בנד אחד בתום ההרצה ואילו בתמיסה לא נקייה נקבל המון חלבונים ויהיה קשה לזיהוי.

<u>שיטות להפרדת חלבונים: איכותיות וכמותיות (הרוב):</u>

1. **Gel electrophoresis-** הרצה והפרדה על גבי **שדה חשמלי** שבו החלבונים מופרדים **על פי גודלם**.
מריצים את החלבונים על גבי פוליאקריל אמיד, חומר זה הוא אינרטי מבחינה כימית (אין לו תגובה עם החלבונים הרצים על המדיום). יצירת פוליאקרילאמיד: מתחילים מתמיסה מימית של אקרילאמיד ובאמצעות חמצון מפלמרים אותו לפוליאקריאמיד. מקבלים שרשראות ארוכות של אקרילאמיד ויחידה אחת של ביס אקריל אמיד שעושה קרוס לינקינג בין יחידות האקרילאמיד. נוצר מדיום שהוא בין נוזל למוצק. צפיפות המדיום נקבעת בהתאם לכמות הביס אקרילאמיד וכמות האקרילאמיד- יותר פוליאקריל אמיד יותר שרשראות. צפיפות גבוהה יותר מותאמת להפרדת חלבונים קטנים יותר (ניתן לשלוט בגדול החורים).
שמים את תמיסת החלבונים מעל הג'יל והחלבונים נעים בשדה החשמלי. עלינו לבטל את המטען החשמלי העצמי של החלבונים משום שההפרדה בשיטה זו היא על פי גודל ולא על פי מטען. כיצד נעשה זאת? דנטורציה עם SDS: מוסף לתמיסת הג'יל שמפלמרים (לכן קרוי SDS polyacrylamide gel) וגם לחלבון עצמו. ה-SDS מפרק כמעט את כל הקשרים הלא קוולנטיים. SDS מקיף את השרשרת הפוליפפטידית בהרבה מולי שבקצה אחד שלהן יש שרשרת פחמנית ארוכה ובקצה השני SO_4^-. הוא טוען שלילית את כל החלבונים ומבטל את השפעת המטענים העצמיים שלהם (כי הם הזניחים לעומת המטען השלילי שהוא מוסיף). ככל שהמשקל המולקולרי יותר גדול כך החלבון ייטען במטען שלילי גדול יותר (SDS נקשר לחלבונים בכמות פרופורציונלית למשקל המולקולרי שלהם).
גם בטא מרקפתואתנול מוסף לתמיסה על מנת לשבור קשרי SS ויחד עם SDS הם פורשים את החלבון לגמרי.
מפעילים שדה חשמלי, החלבונים ירוצו אל הקטודה- הפלוס.
ככל שנריץ יותר, החלבונים יתפזרו יותר- החלבונים הקטנים ירוצו יותר מהר והחלבונים הגדולים יעברו לאט יותר וייקח להם יותר זמן.
החלבונים הם חסרי צבע ולכן על מנת לזהותם עלינו לצבוע אותם בכל מיני שיטות:
<u>צביעה:</u>
- קומסי בלו, כסף.
- שימוש במתיונין מסומן רדיואקטיבית- זוהי שיטה של סימון מטבולי של החלבונים, בתוך התאים עצמם. על מנת לראות את הסימון עושים אוטורדיוגרפיה על גבי פילם, חשיפה לקרני איקס.
<u>גילוי המשקל המולקולרי של חלבון:</u>
מריצים באחת הבאריות חלבונים שמשקלם המולקולרי ידוע ויוצרים עקומת נדידה שלהם. בסקלה לוגריתמית אנחנו רואים את הנדידה של החלבון שמשקלו אינו ידוע לצד עקומת הנדידה של החלבונים שמשקליהם ידועים, כך אנו יכולים למקם את החלבון הלא ידוע ביחס לחלבונים הידועים ולקבוע את משקלו.



2. **Isoelectric focusing-** הפרדה על גבי ג'ל לפי **מטען חשמלי ונקודה איזואלקטרית.** לכל חלבון יש מטען חשמלי התלוי ב-pH. לכל חלבון יש רמת pH מסויימת שבה סך כל המטענים שווה לאפס- נקודה איזואלקטרית (PI). בשיטה זו אנו מריצים חלבונים בשדה חשמלי על גבי עמודה שבה גראדיינט של pH. החלבונים ירוצו כל עוד יש להם מטען. כל חלבון ירוץ מרחק שונה בהתאם לנקודה האיזואלקטרית.

3. **הפרדה דו מימדית על גבי ג'ל:**

לרוב משתמשים בשתי השיטות (שיטה 1 ושיטה 2) יחד.

משתמשים בשתי תכונות של החלבונים : **גודל ומטען.**

הפרדה 1 : על פי נקודה איזואלקטרית- מופרדים על פי מטען חשמלי. הפרדה 2 : על פי גודל- מניחים את העמודה עם החלבונים המופרדים ב-90 מעלות על גבי ג'ל שבו יש SDS.

יתרונות :

1. ניתן להפריד בקלות בין בנדים והם לא מתאחדים אחד עם השני, ניתן להפריד ולראות אפילו חלבונים בודדים.
2. חומצות אמינו עוברות מודיפיקציות כמו פוספורילציה, כשישנו פס לרוחב או מריחה אנו יכולים להסיק כי זהו חלבון עם מודיפיקציה. למשל חלבון שהתווספה אליו קבוצה שלילית כמו פוספט תשנה את ה-PI שלו בעוד המשקל המולקולרי שלו זהה.

<u>שיטות ניקוי חלבונים כמותיות:</u>

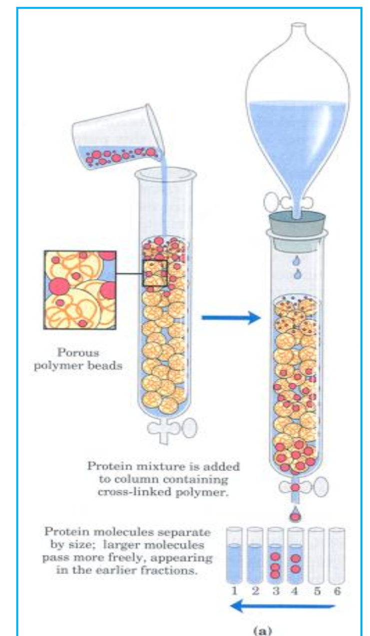
בכל שיטות הניקוי עושים שימוש בקולונה ובתוכה כדוריות אינרטיות המיוצרות בבית חרושת, בעלות תכונות מיוחדות המאפשרות את ניקוי החלבונים על גביהן.

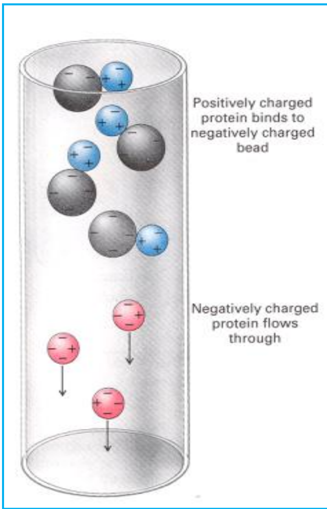
1. <u>פילטרציית ג'ל- כרומטוגרפיה</u> : **הפרדה של חלבונים לפי גודלם.**

בכל כדורית יש תעלות קטנות שדרכן חלבונים יכולים לעבור כתלות בגודלם. ככל שחלבון קטן יותר הוא יעבור דרך ארוכה יותר בתוך התעלות הנמצאות בכדוריות- יותר סיבובים. חלבון גדול אינו יכול להיכנס לתעלות, הדרך שלו למטה יותר קצרה ומהירה ולכן הוא יצא לפני החלבון הקטן. הקולונה מוציאה חלבונים בטווחי משקל מולקולרי מסויימים. יש מכשיר שאוסף לתוך כל מבחנה את הנפח שאנחנו רוצים ונקבל מכל קולונה 40-50 פרקציות.

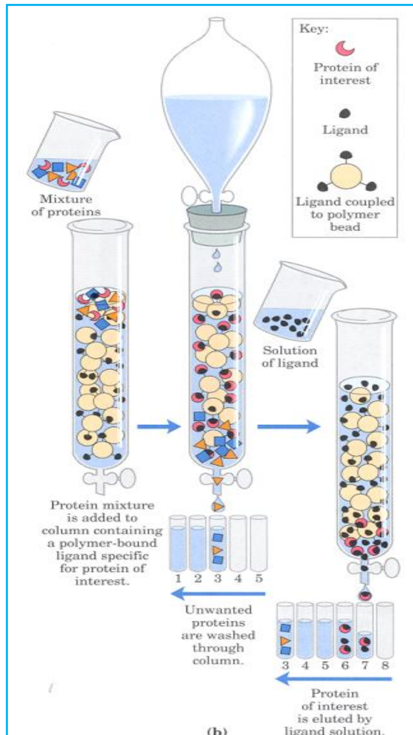
<u>איך נדע באיזה פרקציה החלבון נמצא?</u>

יש לנו מבחן ביולוגי למצוא איפה הפעילות שאנחנו מחפשים נמצאת, מפעילים את המבחן על כל הפרקציות. במספר פרקציות נראה עלייה בפעילות עד הגעה לפיק. לאחר כמה פרקציות הפעילות תעלם. לוקחים את הפרקציות בהן ראינו את הפעילות וממשיכים את הניקיון בשיטה אחרת. כך הצלחנו לנקות חלבונים קטנים יותר וגדולים יותר שנותרו בפרקציות אחרות.

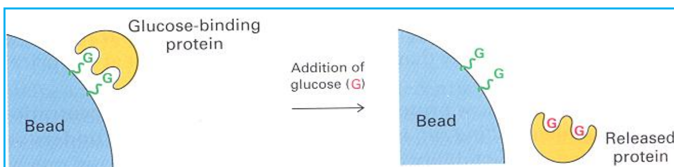




2. כרומטוגרפיה לפי Ion-Exchange : **הפרדה של חלבונים לפי מטענם החשמלי.**
הכדוריות קשורות ליחידות כימיות הנושאות מטען חיובי (או שלילי) ויקשרו לחלבון בעל מטען עצמי שלילי (או חיובי). הקשירה היא לפי חוזק הקשר החשמלי-אלקטרוסטטי. חלק מהחלבונים נקשרים חזק, אחרים חלש, ואחרים עוברים ישירות למטה.
איך משחררים חלבונים שנקשרו בקשר חשמלי?
   א. העלאת ריכוז המלח סודיום כלוריד בתמיסה- המלח יתחרה בקישור שלו אל הכדוריות. ככל שריכוז המלח גבוה יותר הוא ייקשר יותר אל הכדוריות וידחה את החלבון, ככל שחלבון קשור חזק יותר הוא ידרוש יותר מלח על מנת להשתחרר. זוהי דרך לשחרר חלבונים באופן הדרגתי.
   ב. שינוי pH של התמיסה, כל חלבון ישתחרר מהתמיסה כאשר יגיע לנקודה האיזואלקטרית שלו.
יש שני טיפוסי קולונות : משחלף קטיונים- כדוריות טעונות שלילית.
משחלף אניונים- כדוריות טעונות חיובית.
אם החלבון שלנו לא ייקשר בכלל אל הכדוריות של הקולונה, זה לא שלב ניקוי יעיל אבל עדיין ניקוי.



3. כרומטוגרפיית זיקה :
השיטה הטובה ביותר לנקות חלבונים, השיטה הכי ספציפית, מנצלת ידע מוקדם שיש לנו על החלבון. נניח שהחלבון הוא אנזים ואנו יודעים מה הסובסטרט שלו, נקשור אותו אל הכדוריות. לדוגמא חיבור רצף הנוקלאוטידים שהחלבון מזהה אל הכדוריות או חיבור נוגדן שמכוון כנגד החלבון הרצוי שלנו אל הכדורית. האפיניות שלהם, והספציפיות שלהם אל החלבון גבוהות והקישור חזק. ניתן לנקות כמעט בשלב אחד :
בגלל שהשיטה מאוד ספציפית והקישור כל כך חזק ניתן לשטוף במלחים בריכוזים גבוהים ובתנאים קשים את החלבונים האחרים. השיטה הכי טובה לשחרר את החלבון הרצוי מהכדוריות היא להוסיף את אותו ליגאנד הקשור לכדוריות לתמיסה המימית וכך יצירת תחרות. החלבון יכול להדיח את הקישור מהכדוריות. אם בתמיסה יהיה הרבה מאוד ליגאנד הוא ייקשר אל הליגנאד ויודח מהקולונה.
דוגמא :
חלבון הנקשר לגלוקוז- גלוקוז קשור אל הכדוריות והחלבון קשור אל הגלוקוז בקשר קוולנטי. מוסיפים לתמיסה גלוקוז והוא נקשר אל החלבון וכך מדיחים את החלבון מהכדוריות בקולונה.
על מנת לפרק קשר בין נוגדן לחלבון (קשר חזק מאוד) עושים שימוש ברמות pH נמוכות.



קביעת רצף חומצות האמינו של החלבון:

לשם מה עלינו לקבוע את רצף חומצות האמינו של החלבון? כדי לקבוע את פעילותו של החלבון, אותה קובע הרצף ממנו הוא מורכב. חלבונים המבצעים פונקציות דומות בתא מאוד דומים זה לזה מבחינת רצף חומצות האמינו שלהם (חלבונים רבים מבצעים פעולות דומות אך באזורים שונים או בתנאים שונים

בתא). שינויים מסויימים ברצף חומצות אמינו אפשריים. 20-30% מהחלבונים באדם הם פולימורפיים- יש להם חומצה אמינית ורסטילית באוכלוסייה. שינויים אלה לא משנים את תפקוד החלבון.

<u>חשיבות קלינית-</u> חשיפת שינויים קטנים ברצף שגורמים לנטרול חלבונים חשובים ופתולוגיות: לדוגמא, אנמיה חרמשית- שינוי ברצף חומצות האמינו של המוגלובין.

יש מידע השוואתי אבולוציוני- איך חלבונים משתמרים במהלך האבולוציה כאשר הם בעלי תפקיד מהותי לתא.

בדיקת חלבונים בעלי אותו תפקוד באותו אורגניזם- אנלוגוס.

או באורגניזמים שונים- אורתולוגוס.

<u>שיטות לקביעת רצף חומצות האמינו:</u>

הרצף הראשון של חלבון שנחשף היה רצף הורמון האינסולין בשנות ה-50.

שיטות ופעולות שניתן לעשות על חלבונים:

1. <u>הידרוליזה-</u> פירוק של כל הקשרים הפפטידיים והפרדת החומצות האמינו הבודדות כדי לדעת איזה חומצות אמינו יש ומה היחסים הכמותיים ביניהן.
ההידרוליזה מתבצעת בתנאים חומציים ובטמפ' של 110 מעלות.
שימוש בכרומטוגרפיה על מנת להפריד את חומצות האמינו על סמך התכונות הפיזיקליות והכימיות שלהן (מבין סוגי הכרומטוגרפיה שהוזכרו למעלה).
2. <u>שיטה המאפשרת זיהוי החומצה האמינית הראשונה- החומצה האמינו טרמינלית:</u>
שימוש בכימיקלים ניתנים לזיהוי: FDNB או Dabsyl chloride. הכימיקלים הללו יוצרים קשר קוולנטי עם הקבוצה האמינו טרמינלית וכך נקשרים לחומצה האמינית הראשונה, ולמעשה מסמנים אותה. לאחר שהכימיקל נקשר מבצעים הידרוליזה לחלבון. משתמשים באחת משיטות הכרומטוגרפיה ומקבלים dinitrophenyl derivative של החומצה האמינו טרמינלית, בזכות התכונות הספציפיות של הכימיקל המחובר לחומצה וכך ניתן לזהותה.
3. <u>שיטה המאפשרת קביעת רצף חומצות האמינו- דגרדציית אדמן:</u>
שימוש בכימיקל יותר מתוחכם Phenylisothiocyanate- נקשר לקצה האמינו של החומצה האמינית הראשונה. ההבדל בין השלב הזה לקודמו הוא שבהפעלת תנאים חומציים, הכימיקל יוצר קשר ציקלי עם החומצה האמינית הראשונה והיא היחידה שתיפרד משאר חומצות האמינו, מתקבלת כל השרשרת הפפטידית מלבד החומצה האמינית הראשונה.
כאשר נחזור על התהליך הזה פעם אחר פעם (נעשה באופן אוטומטי) וכל פעם נשחרר חומצה אמינית אחת נוכל לגלות את רצף חומצות האמינו של החלבון.

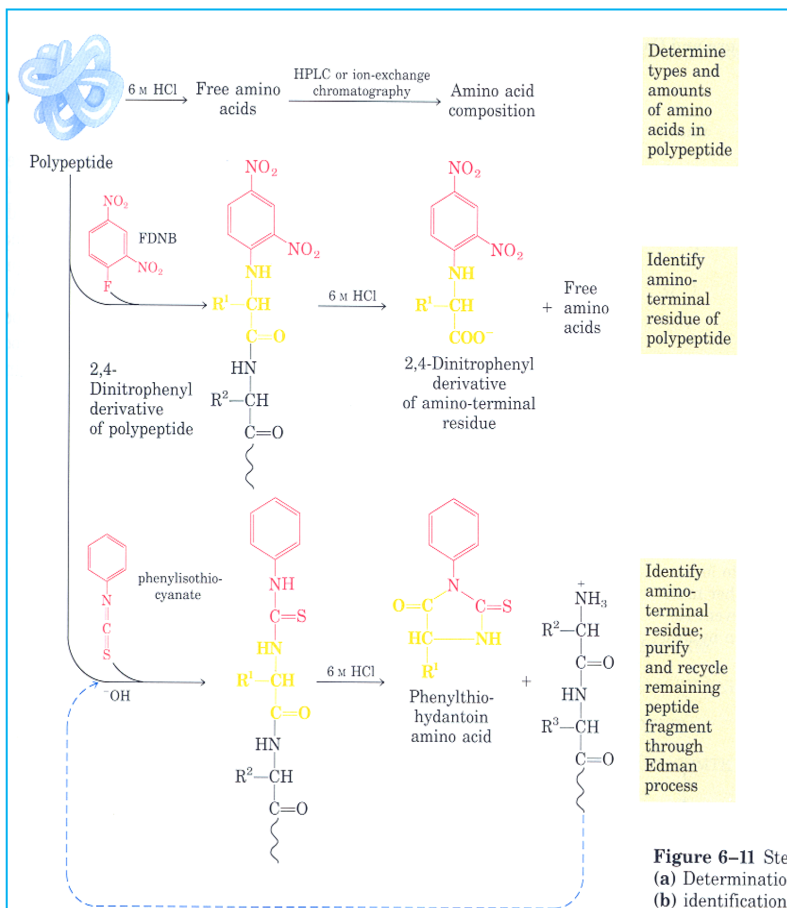


Figure 6–11 Step
(a) Determination
(b) identification

פירוט השיטות:

1. <u>קביעת הרכב חומצות האמינו של החלבון ללא ידיעת הרצף:</u>

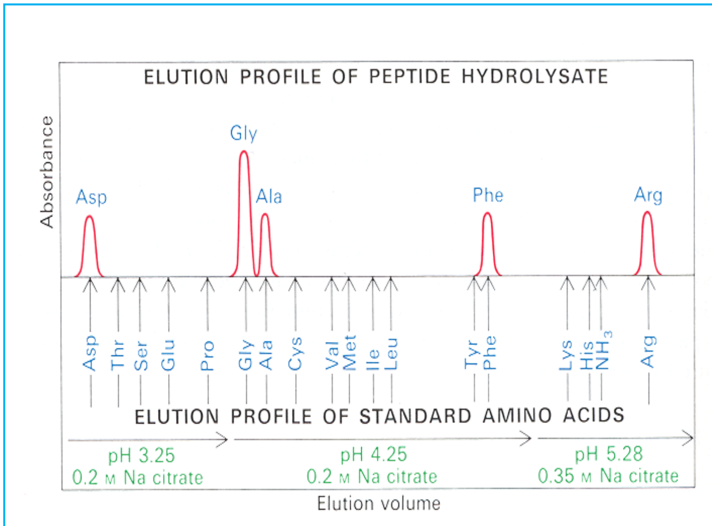
1. הידרוליזה:

110 מעלות (תנאי לחץ), תנאים חומציים 6N HCl (6 נורמל). תנאים קיצוניים אלה גורמים לשבירת הקשרים הפפטידיים. מתקבלת תערובת של חומצות אמינו.

2. מזהים את חומצות האמינו בשיטה כרומטוגרפית, על גבי קולונה שהכדוריות בה קשורות ל- sulfonated polystyrene resin- בעל שתי תכונות המאפשרות להפריד את החומצות האמינו על גביו:

א. הידרופובי- מכיל טבעות בנזניות.

ב. טעון מטען שלילי- קבוצות סולפט קשורות לטבעות הבנזן.



שמים את תערובת חומצות האמינו על הקולונה ועושים אלוציה בתנאים משתנים:

1. תנאי pH משתנים- העלאת pH עם הזמן.
2. תנאי מלח משתנים- העלאת ריכוז המלח עם הזמן.

כל חומצה אמינית יוצאת מהקולונה בתנאים אחרים על פי תכונותיה ואנו יודעים את התנאים המתאימים לכל חומצה. לכן למעשה ישנו סדר מדוייק של יציאת חומצות האמינו בתנאים המשתנים של הקולונה, pattern קבוע שבאמצעותו אנו יודעים איזו חומצה אמינית יצאה ומתי.

לדוגמא:

- אספרטט היא החומצה האמינית הראשונה שיוצאת מהקולונה הזו. אספרטט עצמה נושאת מטען שלילי ולכן היא נדחית מהקולונה ראשונה.
- ארגינין הנושאת מטען חיובי משתחררת אחרונה מהקולונה.

כיצד אנו יודעים שיצאה חומצה אמינית מהקולונה?

מוסיפים למבחנות ninhydrin שמגיב עם חומצה אמינית ויוצר ריאקציית צבע, נוצר צבע כחול ולפי הצבע אנו יודעים שיצאה חומצה אמינית החוצה (הצבע לא מעיד על סוג החומצה האמינית). על פי עוצמת הבליעה של הצבע הכחול אנו יכולים לדעת מהי כמות החומצה האמינית שיצאה ומה היחסים בין כמות חומצה אמינית אחת לאחרות.

לדוגמא:

בפפטיד הזה ניתן לראות שהייתה פי 2 יותר בליעה במבחנה ובה גליצין ולכן ניתן לשער שהיה פי 2 יותר גליצין בפפטיד מאשר חומצות אמינו אחרות.

2. <u>זיהוי השייר האמינו טרמינלי של החלבון:</u>

קישור למרכיב כימי: Fluorodinitrobenzen (FDNB), Dabsyl chloride, Dansyl chloride הקישור למרכיב הכימי נעשה אך ורק לקצה האמינו טרמינלי של הפוליפפטיד. לאחר הקישור עושים הידרוליזה בתנאים של טמפ' גבוהה, לחץ, pH נמוך ומפרקים את החלבון למרכיביו לחומצות האמינו הבודדות ורק החומצה האמינית הראשונה מסומנת. מריצים את כל התערובת בכרומטוגרפיה וכך ניתן לזהות איזו חומצה אמינית קשורה ליסוד הכימי.

3. <u>דגרדציית אדמן:</u>

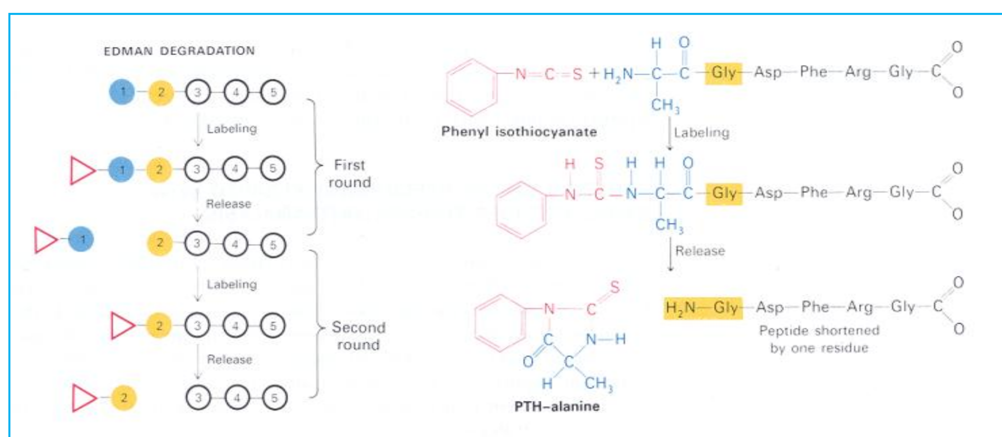
קישור Phenyl isothiocyanate (PTH) לחומצה האמינית הראשונה. קושרים את הפוליפפטיד למצע מוצק בקצה ה-C טרמינלי שלו, כך ניתן להעביר דרכו תמיסות ובכל פעם לשטוף החוצה חומצה אמינית אחת

מהקצה ה-N טרמינלי. נעשה תחת תנאים חומציים מתונים יותר משיטה 2. התהליך חוזר על עצמו: קישור PTH ← שחרור החומצה האמינית הראשונה ← זיהוי ← שוב סימון, שחרור וזיהוי וכן הלאה. כך מתקבל הסדר של חומצות האמינו.

<u>חסרון:</u>

שיטה כימית שנצילותה 98-99%. כלומר, כל פעם שאנו משחררים חומצה אמינית אחת, היא משתחררת רק ב-98% מהשרשראות ואילו 2% מהשרשראות לא שיחררו את החומצה האמינית הראשונה שלהן. לכן, בכל סיבוב שיבוא לאחר מכן יש קונטמינציה (זיהום) של החומצה האמינית הקודמת שלא השתחררה בסיבוב הקודם אך כן משתחררת בסיבוב הזה. הקונטמינציה, הולכת וגדלה עם מספר הסיבובים.

מכאן מגבלת השיטה: ניתן לזהות באמצעותה את הרצף של 50-60 חומצות אמינו ולא יותר, מעל זה מתקבלת תערובת מזוהמת מידי ואנו לא יכולים לקבוע מהי החומצה האמינית שהייתה אמורה לצאת בסיבוב הנוכחי ומהן החומצות המזהמות שהצטברו.



<u>פתרון:</u>

הביוכימאי מפרק חלבון ארוך לפפטידים יותר קצרים שאורכם הוא בין 40 ל-60 חומצות אמינו, לוקח כל פפטיד לחוד, וקובע בכל פפטיד את הרצף שלו.

יש 2 דרכים לחיתוך החלבון:

1. כימיקלים שיודעים לפרק את הקשר הפפטידי לאחר חומצה אמינית מסויימת. דוגמא: cyanogens bromide- נקשר למתיונין ומפרק את הקשר הפפטידי מיד אחריה- הידרוליזה לקשר פפטידי אחד. כלומר שרשרת ובה 5 פעמים מתיונין, תיתן 6 פפטידים קצרים לאחר טיפול בציאנוגן ברומיד.
2. אנזימים פרוטאוליטים- אנזימים שעושים הידרוליזה באופן ספציפי. דוגמא: טריפסין- הידרוליזה של הקשר הפפטידי מיד לאחר חומצות אמינו בסיסיות: ליזין וארגינין. האנזים מזהה את קבוצת הצד של חומצת האמינו נקשר אל חומצת האמינו ומפרק את הקשר הפפטידי שאחריה.

הבעיה שנוצרת לאחר חיתוכים מעין אלה היא שלא יודעים את הרצף של הפרגמנטים עצמם. לכן חותכים את הפוליפפטידים בשתי שיטות שונות- הרצף של הפרגמנטים ייקבע לפי חפיפות של חומצות אמינו בין הפרגמנטים השונים (יובהר בדוגמא).

<u>דוגמא מסכמת: קביעת רצף חומצות האמינו של החלבון:</u>

(בהתבסס על השרטוט בעמוד הבא).

1. <u>קביעת הרכב חומצות האמינו וכמה יש מכל סוג:</u>

שימושים:

א. כיום ישנם מאות רצפי חלבונים במאגרי מידע, כאשר ביוכימאי ניגש לעבוד על חלבון, מסתבר שהחלבון כבר נוקה ורצפו כבר נבדק, הביוכימאי יכול לחסוך את כל העבודה רק בזכות ידיעת ההרכב והשוואתו למאגרי המידע.

ב. הרכב חומצות האמינו של החלבון יאפשר לביוכימאי לבחור את האנזימים או הכימיקלים בהם כדאי לו להשתמש על מנת לחתוך את החלבון לפפטידים הקצרים.

לדוגמא:

בחלבון 2 יחידות של מתיונין, אם נשתמש בציאנוגן ברומיד נקבל 3 פפטידים שונים.

בחלבון 2 חומצות ליזין וחומצת ארגינין- טריפסין יחתוך את הפוליפפטיד 3 פעמים ונקבל 4 פרגמנטים שונים.

2. <u>קביעת הקצה ה-N טרמינלי:</u>

הכניסו DFNB וזיהו dinitrophenylaspargine כלומר, אספרגין הייתה החומצה האמינית הראשונה בפוליפפטיד שאנו מנסים לקבוע את רצפו.

3. חלוקת החלבון הנקי לשתי מבחנות:

למבחנה אחת מוספים ציאנוגן ברומיד.

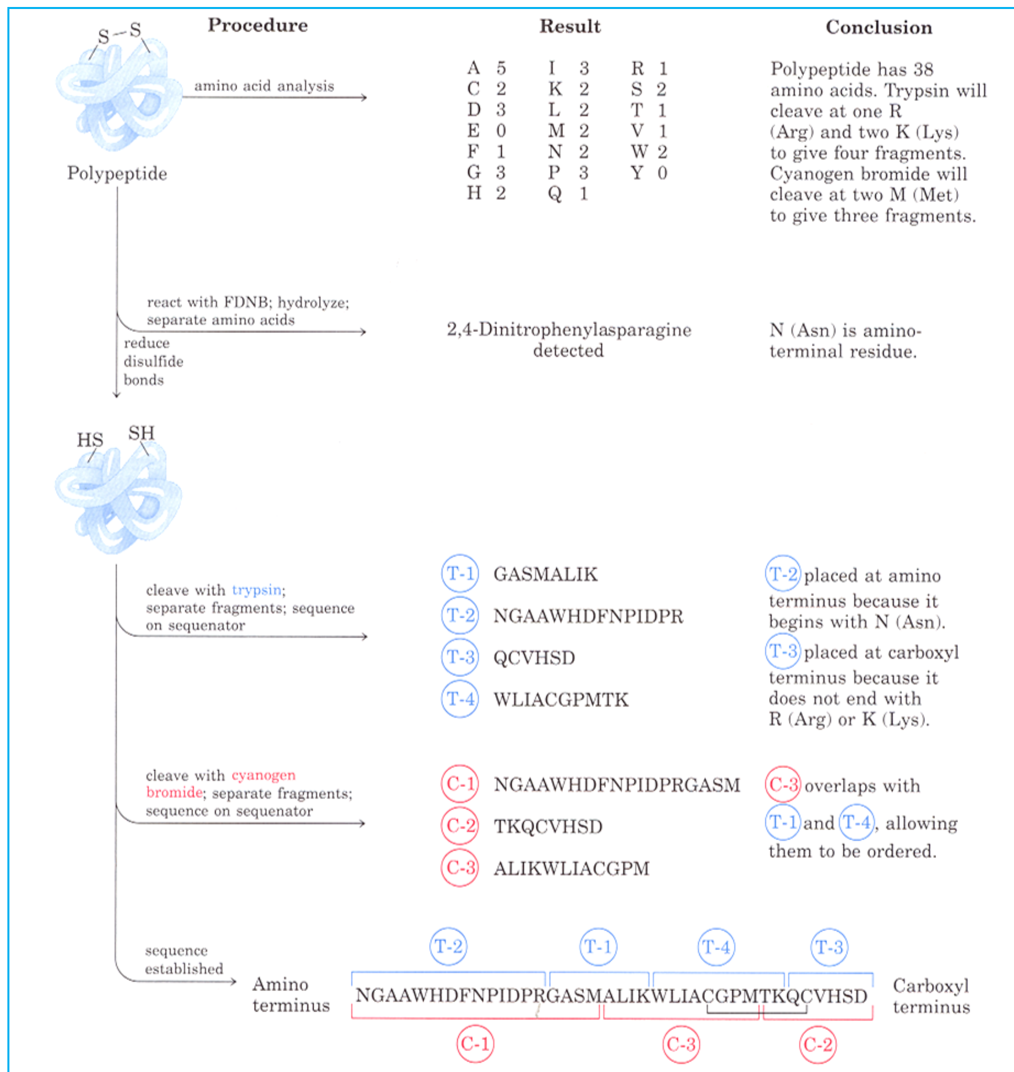
למבחנה השנייה מוסיפים טריפסין.

בכל מבחנה מקבלים תערובת פפטידים- מפרידים בין הפפטידים בשיטה כרומטוגרפית.

4. <u>קובעים את הרצף של כל פפטיד בשיטת אדמן:</u>

עכשיו צריך "לפתור את הפאזל". אנו יודעים שטריפסין חותך אחרי ליזין וארגינין ולכן אם יש לנו פפטיד שמסתיים בליזין או ארגינין הוא כנראה לא הפפטיד האחרון אלא באמצע השרשרת. כלומר, המקטע T3 ממוקם בקצה ה-C טרמינלי (הקצה האחרון של השרשרת) כי אינו מסתיים בליזין או ארגינין.

- החומצה האמינית הראשונה של כל הפוליפפטיד היא אספרגין, את זה אנו יודעים באמצעות שיטה 2 ומכאן שהמקטע T2 ממוקם בקצה האמינו טרמינלי.
- לכן נשאר לקבוע את הסדר בין T1 ל-T4: את זה ניתן לדעת באמצעות חפיפה של מקטעי T עם הפפטידים שנחתכו עם ציאנוגן ברומיד- מקטעי C. הרצף של C3 מרכיב בתוכו חלק מ-T1 וגם חלק מ-T4 ולכן נוכל לדעת מה הרצף ביניהם.



שיטות גנטיות:

קיימים מאגרים של כל ה-mRNA האפשריים והחלבונים אליהם הם מקודדים. לכן אין צורך לרצף את כל החלבון, מספיק לרצף 10 חומצות אמינו ולמצוא באמצעות מאגרי המידע של mRNA ו-cDNA את כל החלבון (כי כל 3 נוקלאוטידים מקודדים לחומצה אמינית).

ישנה מגבלה גם בשיטות אלו: mRNA אינן מעידות על מודיפיקציות ושינויים אחר תרגומיים שחלבונים עוברים (לדוגמא פוספורילציות), אלטרנטיב ספלייסינג, איזופורמים שונים של אותו חלבון (שינויים קטנים כמו חסר של מספר חומצות אמינו בין כמה גרסאות של אותו חלבון).

אנזימים (פרופ"ח אייל בנגל)

אנזימים- זרזים ביולוגים, מזרזים את קצבן של ריאקציות כימיות פי מיליון ויותר. ריאקציות כימיות שבאופן רגיל אינן מתבצעות, מזורזות על ידי אנזימים. הקטליסט מזרז ריאקציה כימית מבלי שישתנה בסוף התהליך, בזמן התגובה הוא משתתף בתהליך וניתן להבחין בשינוי בו אך בסוף התהליך יהיה כפי שהיה בתחילתו. הקטליסט עובד על סובסטרטים שונים והופך אותם לתוצרים כימיים, לכל תגובת אנזים-סובסטרט תוצרים כימיים ספציפיים משלה. אנזים אינו עומד בפני עצמו- כל אנזים מייצר את הסובסטרטים לאנזים הבא אחריו, האנזימים מרכיבים שרשראות מטבוליות:

- **מערכת אנבולית-** בנייה ממרכיבים פשוטים למרכיבים מסובכים.
- **מערכת קטבולית-** פירוק של כימיקלים מורכבים לאבני יסוד.

אנזימים שפעילותם משתבשת במחלות שונות מאוד חשובים (חוסר ייצור או ייצור בעודף)- ניתן לתקן פגמים על ידי החדרת תאים המייצרים אנזימים נורמלים. בתעשייה משתמשים באנזימים לטובת עיבוד מזון.

חשיבות בדיאגנוסטיקה:

זיהוי מחלות:

אנזימים המופרשים במצב של גידולים סרטניים, לאחר התקף לב ישנה רקמה מתה של תאים המפרישה אנזימים לתוך הפזלמה. כך ניתן לזהות אירוע לב או מחלות סרטניות מסויימות.

תכונות האנזימים:

1. **היכולת הקטליטית של אנזימים-** מזרזים ריאקציות כימיות בסדר גודל של פי מיליון ויותר. ריאקציות שללא נוכחות האנזימים לא היו מתרחשות בתנאי חומציות וטמפ' פיזיולוגיים (למשל פירוק של סוכר למים וקרבונדאוקסיד).

2. **ספציפיות האנזימים-** רוב האנזימים פעילים על סובסטרט אחד או מספר קטן של סובסטרטים הדומים זה לזה מבחינה מבנית. כך ניתן לשמור על יעילות גבוהה ואין בזבוז אנרגיה- אין מצב בו אנזים עובד בצורה לא מבוקרת וספציפית ומבזבז אנרגיה.

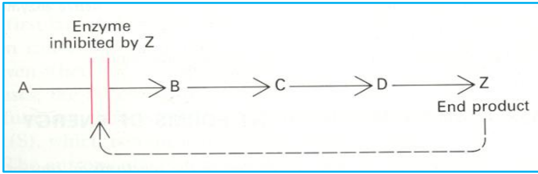
דוגמאות:

סרין פרוטאזות: כל אחת מהן ספציפית לחומצה אמינית אחת או מספר חומצות אמינו והן עושות הידרוליזה בקרבתן.

- **טריפסין-** מכיר את קבוצת הקרבוקסיל של ליזין וארגינין, נקשר אליה באופן המאפשר לו לחתוך אך ורק את הקשר הפפטידי אחרי כל אחת מהן.
- **טרומבין-** (קשור לקרישת דם) מזהה את שתי חומצות האמינו ארגינין וגליצין וחותך את הקשר ביניהן.

3. **דיוק בפעולה-** לדוגמא אנזים שנקרא DNA פולימראז- מסנטז את שרשרת ה-DNA. אנזים מדוייק ופרוססיבי- קושר נוקלאוטידים אחד לשני על גבי תבנית ומסנטז שרשרת שלמה של DNA בקצב של מאות נוקלאוטידים לדקה (קצב גבוה), כמעט ואינו מכניס טעויות- מוטציות (אחת למיליון), בזכות היותו אנזים מורכב הבנוי ממספר תת יחידות שלכל אחת מהן תפקיד אחר בפעילותו:
   א. אחראית להוספת הנוקלאוטידים.
   ב. אחראית למנגנון הסרת נוקלאוטידים שגויים ותיקון הטעות- מזהה אם נכנס נוקלאוטיד שגוי ומחליפה אותו לנוקלאוטיד נכון.

4. **פעילותם של האנזימים מבוקרת על ידי גורמים שונים:**



א. Feedback inhibition- האנזים נמצא בתוך שרשרת מטבולית של יצירת חומר Z מחומר A. ישנם מספר אנזימים הפעילים בשרשרת. התוצר הסופי של השרשרת המטבולית (חומר Z) מבקר את פעילות האנזים הראשון- נקשר אל האנזים הראשון ומעכב אותו. מנגנון ויסות של כמות ה-Z בתוך התא, כאשר הוא מגיע לריכוז מספיק הוא מעכב את האנזים הראשון בשרשרת וברגע שריכוזו יורד הוא משתחרר מהאנזים הראשון והשרשרת מתחילה לייצר את Z פעם נוספת.

ב. חלבוני בקרה/ תת יחידות בקרה- ניתן לחלק אנזימים לשניים:

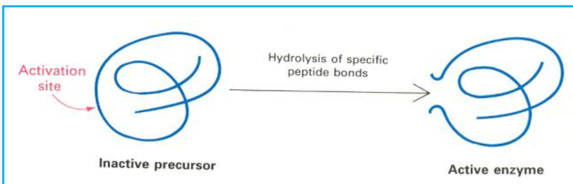
- פעילות קטליטית.
- בקרה:

חלק מהאנזימים מבוקרים על ידי חלבונים נוספים הנקשרים אליהם בתנאים מסויימים, אנזימים אחרים מבוקרים על ידי תת יחידה רגולטורית שהיא חלק מהאנזים עצמו.

לדוגמא, קלמודיולין- חלבון המבקר פעילותם של אנזימים שונים בתוך התא, המשותף לכל האנזימים הללו הוא שהם מגיבים לריכוז הקלציום בתא. כאשר ריכוז הקלציום בתא עולה קלמודיולין קושר אליו קלציום, זה יוצר שינוי מבני ואז הוא קושר אליו אנזימים שונים, לדוגמא myosin light chain kinase. לאחר הקשירה לאנזים הוא יוצר שינוי מבני באנזים עצמו וכך מפעיל את הפעילות הקטליטית שלו, אנזימים אחרים הוא יכול להשתיק.

ג. בקרה באמצעות זרחון:

שינויים אחר תרגומיים- המרכזי שבהם הוא זרחון. חלבונים יכולים לעבור זרחון על חומצות אמינו טריונין, סרין וטירוזין. הזרחון הוא מנגנון מרכזי בבקרת הפעילות של אנזימים, מנגנון מתג: on-off. ישנם אנזימים היודעים לזרז את הוספת הפוספט (קינאזות) ואנזימים המזרזים הסרה של פוספט ע"י הידרוליזה (פוספטאזות). הוספת זרחן משנה את תכונות החלבון בצורה משמעותית, משום שהיא למעשה גורמת להוספת מטענים שליליים לחומצה האמינית וכתוצאה מכך ישנם קשרים בתוך החלבון שמשתנים ושינוי מבני של החלבון, כך נחשף או מכוסה אתר פעיל של החלבון.



ד. **ביקוע פרוטאוליטי-** אנזימים המסונטזים בצורה לא פעילה (במצב זה נקראים בשם זימוגנים), ומשופעלים בזמן ובמקום הנכונים ע"י פירוק פרוטאוליטי.

2 משפחות עיקריות:

חלבוני העיכול- מסונטזים חלקם בלבלב בצורה בלתי פעילה ומשם מופרשים למערכת העיכול ושם מבוקעים על ידי אנזימים מסויימים שהופכים אותם לפעילים על ידי חשיפת אתר הפעילות שלהם. ההפעלה של ההידרוליזה הינה חד כיוונית- אין מנגנון שמאפשר חזרה למצב לא פעיל (בניגוד לשיטות הקודמות). אין אפשרות לחבר חזרה את השרשרת. הדרך להיפטר מאנזימים כאלה- דגרדציה או הרחקה ממערכת העיכול. לדוגמא: טריפסינוגן מסונתז בלבלב ומשופעל ע"י ביקוע פרוטאוליטי במעי הדק שהופך אותו לטריפסין.

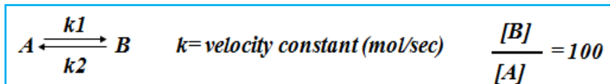
חלבוני מערכת קרישת הדם.

5. **אנזימים ממירים צורות שונות של אנרגיה:**

- המרת אנרגיית אור לאנרגיה (פוטוסינטזה).
- מיטוכונדריה- פירוק של סוכרים ויצירת אנרגיה (כימית) בצורה של ATP.

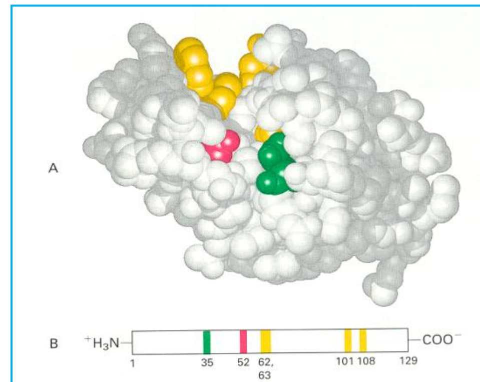
- בשריר- אנזימים ממירים אנרגיה כימית של ATP לאנרגיה מכנית.

6. **<u>אנזים יכול לזרז ריאקציה אך הוא לא יכול לשנות את שיווי המשקל של הריאקציה הכימית</u>-** קבוע שיווי המשקל מעיד על היחס בין התוצרים למגיבים, האנזים אינו יכול לשנות את היחסים בין המגיבים לתוצרים. הוא יכול לשנות את שני הקבועים באותו יחס. הריאקציה תגיע לשיווי משקל בנוכחות האנזים במהירות גדולה מאוד אך היחסים יישמרו.

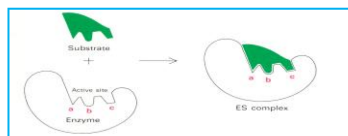


No enzyme: $k1=10^{-4}$ $k2=10^{-6}$
With enzyme: $k1=10^{4}$ $k2=10^{2}$

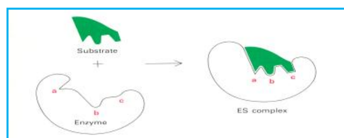
7. **<u>לאתרים הפעילים (יחידות העבודה) של האנזימים יש מאפיינים דומים:</u>**



א. האתר הפעיל הוא חלק יחסית קטן מכל השרשרת הפוליפפטידית.
ב. האתר הפעיל בנוי מחומצות אמינו המגיעות מחלקים שונים של הפוליפפטיד בגלל הקיפול של הפוליפפטיד המקרב חומצות אמינו הרחוקות אחת מהשנייה מבחינת הרצף.
בתמונה- ליזוזום: החומצות המסומנות בצהוב- חשובות ליצירת הקשר עם הסובסטרט. החומצות המסומנות ירוק ואדום- אחראיות לתהליך הקטליטי. ניתן לראות שהן רחוקות ברצף אך קרובות אחת לשנייה באתר הפעיל.
ג. האתר הפעיל יוצר אינטראקציות רבות עם הסובסטרט- כך ניתן לשמור על ספציפיות בין האנזים לסובסטרט. יש **התאמה מבנית** גדולה בין הסובסטרט לאנזים ולכן נוצרים קשרים רבים. הקשרים הם אינם קשרים קוולנטיים אלא **קשרים חלשים.**
ד. האתר הפעיל הוא שקע- מאפשר ספציפיות רבה. רק מולקולות הלוקחות חלק בפעילות הקטליטית יתאימו לשקע זה.
קיימות 2 תיאוריות בנוגע לקשרים:

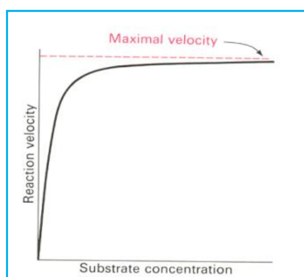


א. **תיאוריית אמיל פישר- המפתח והמנעול-** הסובסטרט מתאים למבנה האתר הפעיל של האנזים.



ב. **תיאוריית קושלן- התאמה מושרית-** (חדשה יותר והיא הנכונה) כאשר האנזים קושר את הסובסטרט הוא יוצר שינויים מבניים בעצמו ובסובסרט, על מנת שהוא יתאים אל הסובסטרט, ההתאמה הזו היא המאפשרת את הקטליזה- הזירוז הקטליטי של הריאקציה הכימית. התאמה מושרית- אינה קיימת מראש.

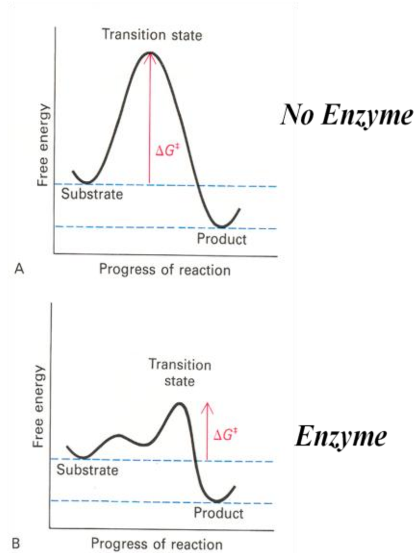
8. **<u>יצירת קומפלקס אנזים סובסטרט הוא השלב הראשון בפעילות קטליטית</u>**

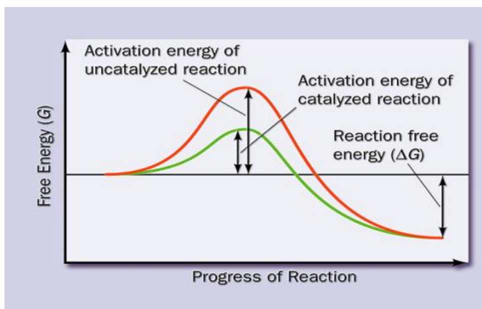


אנזימים תמיד יוצרים קומפלקס עם הסובטרט שלהם ע"י יצירת אינטראקציות בין האנזים לסובסטרט. השלבים הם:
1. קישור ליצירת הקומפלקס.
2. השלב הקטיליטי- האנזים משנה את הסובסטרט ← מתקבלים אנזים ותוצר.
ההוכחה העיקרית לכך היא ניסיונית: מבחינה קינטית אם נכניס ריכוזים עולים של סובסטרט לאנזים, כאשר נגיע ליכוז מסויים, יתקבל פלאטו- האנזים הגיע למהירות

המקסימלית שלו ומצוי ברוויה, לא משנה כמה סובסטרט נוסיף, כל האנזים תפוס עם סובסטרט.
באופן ישיר יותר ניתן לראות את הקומפלקס עצמו באמצעות קריסטלוגרפיה- ניתן לדעת אילו קשרים כימיים נוצרים בין האנזים לסובסטרט.

9. **<u>האנזימים מזרזים את הקצב של הריאקצייה הכימית ע״י הורדת אנרגיית אקטיבציה-</u>** מבחינה תרמודינמית, התהליך ניתן לתיאור על ידי דיאגרמת האנרגיה של הריאקציה הכימית. ישנו הר אנרגטי שצריך לעבור על מנת שהריאקציה תתרחש- אנרגיית אקטיבציה (דלתא G). ככל שאנרגיית האקטיבציה גבוהה יותר הריאקציה מתרחשת לאט יותר ולהיפך. האנזים למעשה מוריד את אנרגיית האקטיבציה של הריאקציה הכימית, בעצם היצירה של הקשר עם הסובסטרט- כל הקשרים בין האנזים לסובסטרט תורמים לירידת הצורך בהשקעת האנרגיה. לכן האנזים מוריד את אנרגיית האקטיבציה וכך מזרז את הריאקציה. הדבר היחיד שאינו משתנה הוא רמות האנרגיה של הסובסטרט ושל התוצר- הוכחה נוספת לכך שהאנזים אינו משנה את שיווי המשקל ביניהם. יש נטייה ליצור יותר את המרכיב שנמוך יותר מבחינה אנרגטית- במקרה והתוצר הוא הנמוך יותר מבחינה אנרגטית הריאקצייה תטה לכיוון התוצרים (אם אנרגית התוצרים נמוכה מאנרגיית המגיבים, דלתא G יהיה שלילי, והריאקציה תועדף לכיוון התוצרים).





- **מצב מעבר-** הנקודה האנרגטית הגבוהה ביותר- מתארת מצב אנרגטי תרמודינמי שבו האנזים והסובסטרט יכולים לשוב ולחזור למצב ההתחלתי או להתקדם בריאקציה ולקבל תוצרים.
- **אנרגיית אקטיבציה-** הפרש בין רמת אנרגיה התחלתית לרמת אנרגיה של מצב המעבר.

ניתן להעלות להגביר את קצב התגובה גם בדרכים נוספות:
א. העלאת טמפרטורה- יותר תנועה של המגיבים והתנגשויות המגבירות את הסיכוי לפגישת אנזים סובסטרט (העלאת רמת אנרגיה של המגיב והקטנת אנרגיית אקטיבציה).
ב. העלאת כמות המגיבים- שוב מגדילים את ההסתברות שהם יפגשו אחד את השני ויגיבו.

לאורך הריאקציה בנוכחות האנזים ישנם תוצרי ביניים:
גבעה ובה יצירת קומפלקס אנזים סובסטרט –ES.
גבעה קטנה יותר ונוצר קומפלקס אנזים תוצר- EP.
פירוק של הקומפלקס- תוצרים ואנזים נפרדים זה מזה.
כאשר ישנה ריאקציה אנזימטית המפורקת למספר שלבים, השלב קובע המהירות הוא השלב בו אנרגיית האקטיבציה היא הגבוהה ביותר.

- **שלב קובע מהירות-** השלב האיטי ביותר והוא הקובע את מהירות הריאקציה.

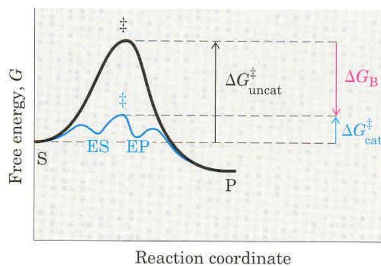
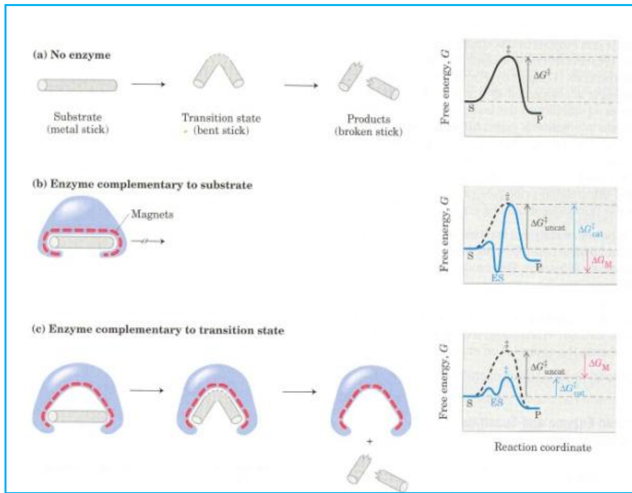


figure 8–6
Role of binding energy in catalysis. To lower the activation energy for a reaction, the system must acquire an amount of energy equivalent to the amount by which $\Delta G^{\ddagger}$ is lowered. Much of this energy comes from binding energy (ΔG_B) contributed by formation of weak noncovalent interactions between substrate and enzyme in the transition state. The role of ΔG_B is analogous to that of ΔG_M in Figure 8–5.

<u>כיצד אנזים מוריד את אנרגיית האקטיבציה לרמות נמוכות יותר?</u>



דימוי להמחשה: ניקח מקל מתכת שאנו מעוניינים לשבור אותו, אנו תופסים אותו בשני קצותיו ומכופפים עד שהוא נשבר. מצב מעבר- מצב בו המקל כמעט שבור.

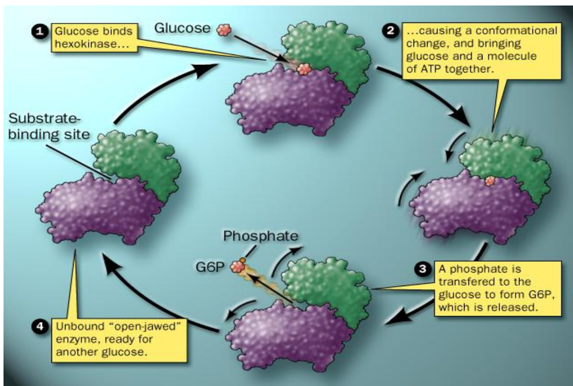
מגנט שיעזור בשבירת מקל המתכת:

אם המגנט מתאים למקל במצבו ההתחלתי, אז הוא יוצר איתו הרבה קשרים מגנטיים, אך האנזים במצב זה לא תורם הרבה לשבירת המקל- דוגמא זו מתאימה לתאוריית המפתח והמנעול שאינה נכונה. מתקבל משהו מאוד יציב מבחינה אנרגטית ועכשיו כדי לשבור את המקל יש צורך לשבור את כל הקשרים היציבים שנוצרו.

אם המגנט והמקל מתאימים זה לזה במצב המעבר, אז המקל מתעקם ויוצר עם המגנט קשרים הנוצרים באופן הדרגתי ← הקשרים הם אלו שגורמים למוט להתקפל עוד ועוד עד שבסוף צריך להשקיע רק עוד קצת אנרגיה והוא נשבר.

ובמונחי אנזים סובסטרט- כל הקשרים הנוצרים בין אנזים לסובסטרט במצב המעבר הם אלה התורמים את היכולת להוריד את אנרגיית האקטיבציה.

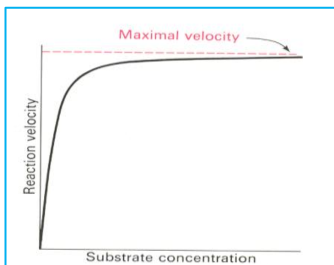
אנזים מזרז קישור בין מספר מגיבים ליצירת תוצר סופי בזכות היכולת לקשור את אותם מגיבים. האנזים מביא את שני התוצרים למצב בו הם נמצאים זה בסמוך לזה, הסמיכות היא המאפשרת לריאקציה לקרות- מגדיל את הסיכוי של התוצרים להיפגש לעומת מצב בו כל אחד מהם היה נע בנפרד ובאופן חופשי בתוך תמיסה. כך הריאקציה מתרחשת כמעט באופן ספונטני.



האנזים לא רק קושר את המגיבים ומביא אותם קרוב אחד לשני אלא שגם הקבוצות הכימיות הפעילות מועמדות קרוב אחת לשנייה.

דוגמא- <u>הקסוקינאז</u>: קושר אליו גלוקוז ו-ATP והתוצר הוא גלוקוז 6 פוספט. האנזים קושר גלוקוז לאתר הפעיל שלו וכתוצאה מקישור הגלוקוז (מודל הקישור המושרה) נוצר שינוי מבני באנזים והאתר הפעיל נסגר סביב הגלוקוז. כך נוצר מצב בו ה- ATP מועמד בדיוק מול הקבוצה הפעילה של הגלוקוז. האתר הפעיל נפתח והתוצר משתחרר מהאנזים.

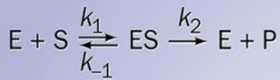
<u>מודל הקינטיקה של מיכאליס מנטן:</u>



הגרף מתאר את קצב הריאקציה בנוכחות כמות קבועה של אנזים וכמות עולה של סובסטרט. ניתן לראות שמהירות הריאקציה עולה עד שבריכוזי סובסטרט גבוהים, מהירות הריאקציה מקבלת ערך מקסימלי. האנזים הגיע לקיבולת מלאה ולכן לא משנה כמה סובסטרט נוסיף, המהירות לא תשתנה, כל האנזים בתמיסה פעיל.

מודל מיכאליס מנטן מנסה לתאר את ההתנהגות הזו באופן מתמטי. המודל מדבר על אנזים אחד מול סובסטרט אחד. ומחלק את הריאקציה האנזימטית לשני שלבים, לכל שלב קבוע מהירות:

1. שלב יצירת קומפלקס אנזים- סובסטרט K_1.



2. שלב קטליטי בו הריאקציה הכימית מתרחשת- האנזים והתוצרים נפרדים זה מזה K_2.

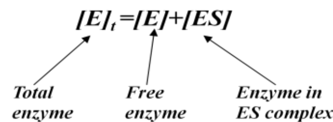
הנחות:

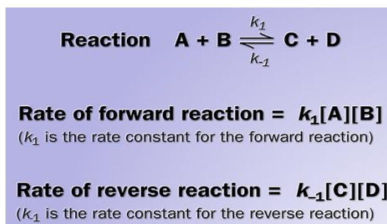
1. אם נמדוד את מהירות הריאקציה בשלבים מספיק מוקדמים, ריכוז התוצר הוא 0. ולכן הריאקציה ההופכית בין P (product) ל- ES עדיין אינה קיימת. אנו מודדים את המהירות בשלבים הראשונים של הריאקציה בלבד ולכן משוואת מיכאליס מנטון תתייחס למהירות התחלתית V initial.
2. היצירה של הקומפלקס ES היא השלב המהיר ביותר בריאקציה: $K_1>K_2$. השלב הקטליטי הוא שלב יותר מורכב ואיטי והוא השלב מגביל מהירות. לכן מהירות הריאקציה האנזימטית תלויה בריכוז של ES וקבוע קטליטי K_2: $V=k_2[ES]$.

אנו לא יכולים למדוד את הריכוז של [ES]. אנו יכולים למדוד את כמות הסובסטרט שהכנסנו ואת הריכוזים הכוללים של האנזים. לכן, על מנת למצוא את המהירות של ריאקציה, אנו צריכים נוסחה המשתמשת אך ורק בריכוזים הללו.

המהירות המקסימלית של ריאקציה Vmax מתרחשת כאשר כל האנזים מצוי בקומפלקס עם סובסטרט (החלק של הפלאטו בגרף): $Vmax=k_2E_t$.

מניפולציה מתמטית שתאפשר לנו למדוד את ערכי [ES]:



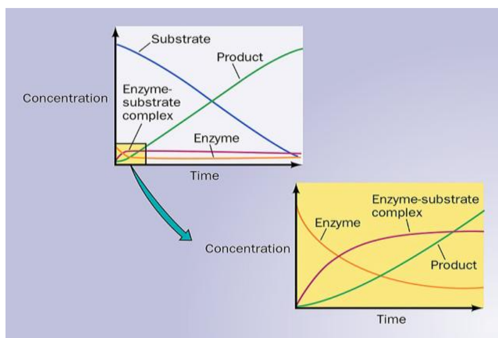


ריאקציה מסדר שני תלויה בריכוזים של שני משתנים.

במצב של שיווי משקל K_1 ו-K_{-1} שווים זה לזה.

כאשר אנחנו מערבבים אנזים וסובסטרט ובוחנים את הריכוזים לאורך זמן:

- ריכוז האנזים יורד.
- ריכוז הקומפלקס אנזים-סובסטרט עולה.
- ריכוז התוצרים עולה.



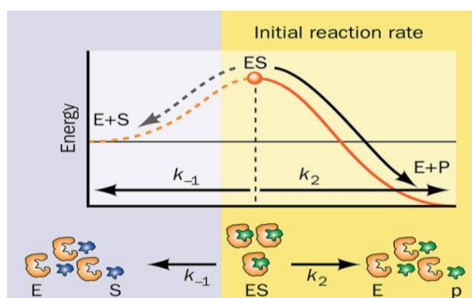
תוך מילי שניות הריאקציה מגיעה לשיווי משקל שבו קצב היצירה וקצב הפירוק של הקומפלקס אנזים- סובסטרט שווים זה לזה. ניתן לראות זאת כאשר ריכוז [ES] מגיע לגודל שנשאר כמעט קבוע.

יצירת קומפלקס אנזים-סובסטרט מתרחש מהר ולכן הקבוע K_1 גבוה מאוד.

קצב יצירת קומפלקס אנזים סובסטרט:

$$\frac{\Delta[ES]}{\Delta t} = k_1[E][S]$$

Rate of formation of ES



הקומפלקס מתפרק לשני הכיוונים:

1. פירוק בחזרה לאנזים וסובסטרט, כל אחד מהם בנפרד, K_{-1}.
2. המשך הריאקציה וקבלת אנזים ותוצר, K_2.

קצב פירוק הקומפלקס נתון ע"י:

$$-\frac{\Delta[ES]}{\Delta t} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

במצב של שיווי משקל קצב הפירוק וקצב היצירה של קומפלקס ES שווים.

$$\frac{\Delta[ES]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[ES]}{\Delta t}$$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

Steady state kinetics

השינוי בריכוז [ES] לאורך זמן שווה ל-0 :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

ריכוז האנזים החופשי שווה לריכוז ההתחלתי פחות ריכוז [ES], כלומר ריכוז האנזים שמשתתף ביצירת הקומפלקס :

Free enzyme concentration ([E])

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

$$\underbrace{k_1([E]_0 - [ES])[S]}_{\text{Formation of ES complex}} = \underbrace{k_{-1}[ES] + k_2[ES]}_{\text{Breakdown of ES complex}}$$

מבודדים את כל הקבועים בצד אחד של המשוואה ואת כל המשתנים בצד השני של המשוואה, מאחדים את כל הקבועים תחת קבוע אחד ששמו קבוע מיכאליס- Km.

$$\frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

The Michaelis constant (K_m)

In such case: $[ES] = \frac{[E]\,[S]}{Km}$ *If we put in the equation [E]=[Et] -[ES] we get:* $[ES] = \frac{[Et]\,[S]}{Km} - \frac{[ES]\,[S]}{Km}$

This regenerates to: $[ES] = \frac{[Et]\,[S]}{[S]+Km}$

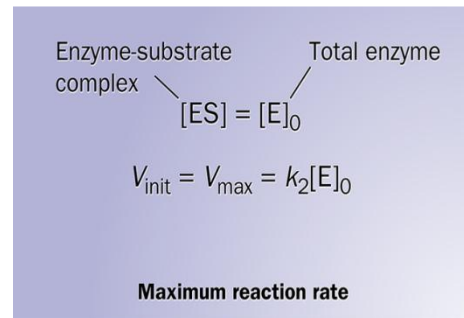
בשלב הבא נציב במשוואת המהירות שהצגנו בהתחלה את הערכים המדידים במקום ריכוז [ES] שכאמור אינו מדיד :

If we insert the value of [ES] in the equation for velocity $V=k_2[ES]$ *We get* $V = \frac{k_2\,[Et]\,[S]}{[S]+Km}$

זוהי משוואת מיכאליס מנטן- משוואת מהירות של אנזים פשוט.

כמו שכבר נאמר המשוואה מדברת על מדידה בשלבי הריאקציה המוקדמים כאשר העלמות סובסטרט ויצירת תוצר הם לינאריים, בשלבים מאוחרים יותר מגיעים למצב של שיווי משקל ואז אנו לא יכולים לחשב.

כאשר כל כמות האנזים ההתחלתית המעורבת בריאקציה תפוסה על ידי סובסטרט Vint=Vmax :



ואז אנו יכולים לבטא את משוואת מיכאליס מנטן כך :

$$V_{init} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{init} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Michaelis-Menten Equation

<u>מה ניתן ללמוד ממשוואת מיכאליס- מנטן?</u>

1. מדידת מהירות ריאקציה בריכוזי סובסטרט גבוהים :

   Km<<[S]

   ניתן להזניח את Km ולכן :

   אנו מקבלים ש- V=Vmax (כי במשוואה האחרונה ריכוזי [S] מצטמצמים).

   לכן, במצב בו ריכוזי הסובסטרט גבוהים מהירות התגובה אינה תלויה בריכוז הסובסטרט.

2. מדידת מהירות ריאקציה בריכוזי סובסטרט נמוכים :

   Km>>[S]

   ניתן להזניח את [S] במכנה.

   אנו מקבלים :

   $$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m}$$

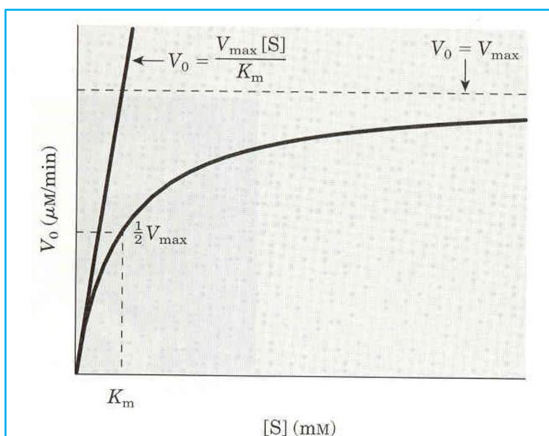
   לכן, במצב בו ריכוזי הסובסטרט נמוכים מהירות הריאקציה תלויה באופן ישיר ב-[S], ריאקציה מסדר ראשון. מתקבלת משוואה לינארית- ככל ש-[S] עולה המהירות V עולה כי שאר מרכיבי המשוואה הם קבועים. ממצא זה מתאר את השלבים המוקדמים של הגרף.

3. כאשר Vint שווה למחצית מ- Vmax.

   ניתן לקבל:

   $$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

   ואז [S]=Km :



הריאקציה מגיעה למחצית ממהירותה המקסימלית כאשר ריכוז הסובסטרט שווה ל-Km. Km מתאר את ריכוז הסובסטרט הגורם לאנזים לפעול בחצי ממהירותו המקסימלית, נמדד ביחידות של ריכוז סובסטרט.
כלומר, Km הוא מדד לטווח היעילות של אנזים כלפי סובסטרט מסויים- מתאר את טווח הריכוזים של הסובסטרט בהם האנזים יעיל.

משמעות Km, Kcat (K2):

- Km- קבוע האפיניות של האנזים והסובסטרט, קבוע ההכרה.

לדוגמא כאשר נתון Km של אנזים מסויים= 1µM, המשמעות היא שבריכוז סובסטרט של 1µM האנזים יגיע לחצי ממהירותו המקסימלית. זה הריכוז בו האנזים יהיה פעיל ויזהה את הסובסטרט, אם נשים רק nM של סובסטרט האנזים בכלל לא יזהה אותו, זאת מכיוון שבריכוזים נמוכים מ-Km הגרף מאוד תלול והריאקציה מאבדת את יעילותה מאוד מהר.
הגדרת Km כקבוע האפיניות נכונה כאשר Kcat הוא גודל קטן יחסית ל- K_{-1} ו-K_1, במצב זה ניתן להזניח את השפעתו של Km (ניתן לראות על פי הנוסחא).

$$Km = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

ערך גבוה של Kcat יגרום לקבלת ערך גבוה של Km ובמקרה זה Km לא יבטא את האפיניות.
מתוך הנוסחא של Km ניתן להבין שככל ש-Km קטן יותר האפיניות שלו לאנזים גדולה יותר- כי אז k_{-1} קטן מאוד לעומת K_1.

- Kcat- קבוע מהירות המתאר את הריאקציה הכימית אותה האנזים מזרז. הערך נותן את קצב היצירה של תוצר בתנאים אופטימליים של האנזים, כלומר במצב בו האנזים ברוויה. מבוטא ביחידות של אחד חלקי שנייה, Turn over number- מספר מולקולות הסובסטרט ההופכות לתוצר עבור מולקולת אנזים פר שנייה.

- יעילות קטליטית של אנזים:

צריך להתחשב בשני דברים:
Km- מבטא את השלב הראשון של הריאקציה.
Kcat- מבטא את השלב השני של הריאקציה.
Kcat/Km- מדד עבור יעילות וספציפיות האנזים.
ככל שהוא גדול יותר האנזים יעיל יותר, מכיוון שעבור:

1. Kcat גבוה יותר האנזים יעיל יותר.
2. Km קטן יותר ההכרה מתרחשת בריכוזים נמוכים יותר.

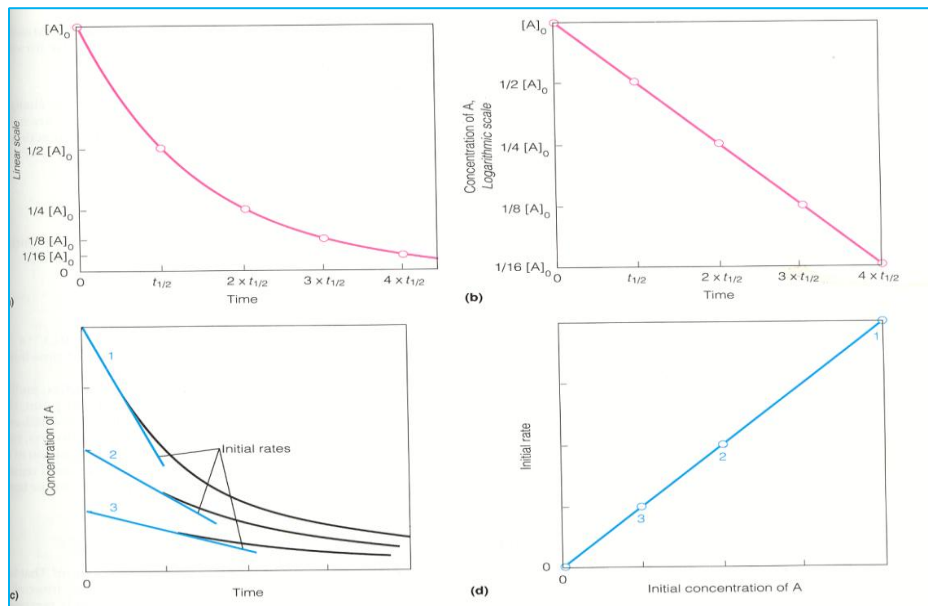
ניתן להשוות בין שני אנזימים המזרזים אותה ריאקציה באמצעות ערך זה.
(ניתן להבין את היחס הזה טוב יותר כאשר מחשבים מצב בו ריכוז הסובסטרט מאוד נמוך [S]<<Km.
במצב כזה, רוב האנזים שהכנסנו חופשי $[E]_t \sim [E]$
במצב זה המשוואה הופכת ל:

$$V = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_M}$$

ניתן לראות ש- Vmax יכול להשתנות אם שמים יותר אנזים.
Kcat/Km הוא קבוע קצב מסדר שני עבור ריאקציה בין סובסטרט לאנזים חופשי).

איך בודקים האם ריאקציה אנזימטית מתנהגת על פי מודל מיכאליס מנטן? כיצד מודדים את ערכי Kcat וערכי Km?

ישנה בעייתיות, אם מערבבים אנזים עם סובסטרט ומנסים לעקוב אחר העלמות הסובסטרט במשך הזמן, כי מהירות התגובה תשתנה עם הזמן (תהפוך ללא לינארית) ויהיה קשה לעקוב אחריה. לכן קל יותר, לערוך ריאקציות עם ריכוז אחד של אנזים וכמה ריכוזים שונים של סובסטרטים. ידוע לנו ריכוז הסובסטרט ההתחלתי, השינוי ב-[S] הוא לינארי אם הוא נמדד עבור זמן קצר, מספר דקות (ניתן למדוד את יצירת התוצר במקום את העלמות הסובסטרט). מכאן שאנו יכולים לקבל ערכי V עבור ריכוזי סובסטרט שונים, כאשר בריכוזים גבוהים נראה מהירות גבוהה יותר.



אנו צריכים להציב את התוצאות במשוואת מיכאליס מנטן על מנת לחשב את Vmax ו-Km. כדי לעשות זאת עלינו לשנות את משוואת מיכאליס מנטן על מנת לקבל גרף לינארי.

Michaelis-Menten equation

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Take the reciprocal of both sides

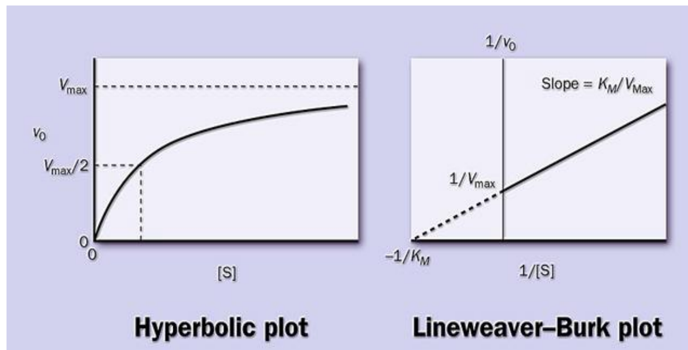
$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = mx + b$$

מחלקים את אחד בכל אחד מצדדי המשוואה (מתקבלת המשוואה הרציפרוקלית למשוואת מיכאליס מנטן), מתקבלת משוואה לינארית- ***Lineweaver Burk Equation***



בישר זה:

נקודת החיתוך עם ציר X= -1/Km.

נקודת החיתוך עם ציר Y= 1/Vmax.

אם ידוע לנו הערך של Vmax נוכל לגזור ממנו את Kcat באמצעות ידיעת [E]t (שאותו אנו יודעים כי אנחנו יודעים כמה אנזים הכנסנו לריאקציה) באמצעות הנוסחה:

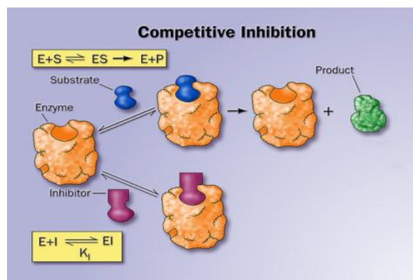
$Vmax= k_{cat}[E]_t$.

מעכבים של ריאקציות אנזימטיות:

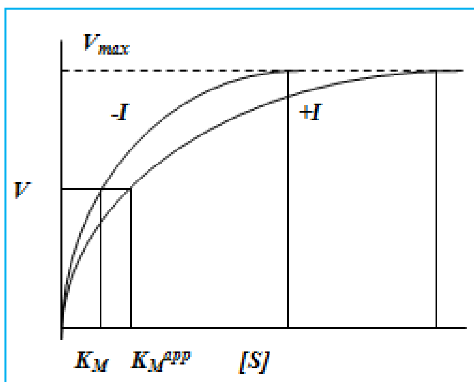
1. <u>עיכוב הפיך, רברסיבלי</u>: אנזים, סובסטרט ומעכב. מעכב הנקשר לאנזים בקשרים שאינם קוולנטיים- ומעכב את פעילותו הקטליטית. מעכבים הפיכים מתנהגים כמו הסובסטרט מגיעים לשיווי משקל עם האנזים, נקשרים אל האנזים ומתפרקים ממנו.
2. <u>עיכוב בלתי הפיך</u>: רעלנים, טוקסינים טבעיים או מלאכותיים. לדוגמא גז העצבים- מעכב בלתי הפיך של אנזים. נקשרים בקשר קוולנטי לאנזים, בדר"כ לאתר הפעיל של האנזים ומעכבים את פעילות האנזים.

<u>עיכוב רברסיבלי</u>:

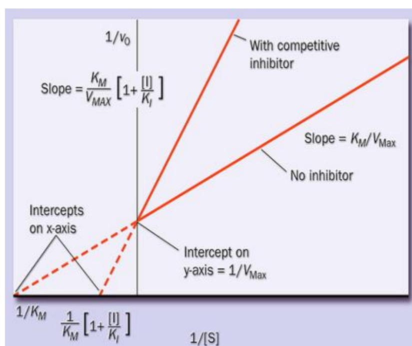
קיימים מס' סוגי מעכבים רברסבילים אשר מפחיתים את פעילות האנזים:



1. **<u>עיכוב תחרותי</u>:** המעכב דומה מאוד לסובסטרט מבחינה מבנית וכתוצאה מכך המעכב מתחרה עם הסובסטרט על הקישור לאתר הפעיל. אנזים עם אתר פעיל, או שהסובסטרט נקשר או שהמעכב נקשר לאותו אתר קישור, וכך למעשה יש תחרות. לאנזים יש השפעה על הסובסטרט אך לא על המעכב. כמו שלסובסטרט יש ערך Km (אפיניות), גם למעכב יש ערך Ki- קבוע דיסוציאציה של המעכב. קומפלקס אנזים-מעכב נקרא EI.



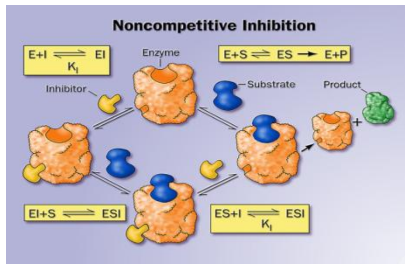
כאשר יש קומפלקס אנזים-מעכב נקבל פחות תוצר. העיכוב משפיע על ה-Km של האנזים. ניתן להשוות שתי עקומות- אחת עם מעכב ואחת בלעדיו. בכל ריכוז של הסובסטרט נקבל מהירות נמוכה יותר כי בכל מצב ישנה נוכחות של מעכב והסובסטרט לא יכול להיקשר. אם מוסיפים עוד ועוד סובסטרט אז נגיע ל-Vmax למרות נוכחות המעכב, אבל הערכים של הסובסטרט שאנו צריכים על מנת להגיע לכך יותר גבוהים מאשר ללא נוכחות המעכב. המעכב משנה את ה-Km apparent. כדי להגיע לחצי מהירות מקסימלית נצטרך ריכוזים גבוהים יותר של הסובסטרט ולכן ערך Km גדל אבל Vmax אינו משתנה, שימוש בריכוזים מספיק גבוהים של סובסטרט יביאו אותנו ל-Vmax. מכאן, **מעכב תחרותי- משפיע של Km ואינו משפיע על Vmax.**



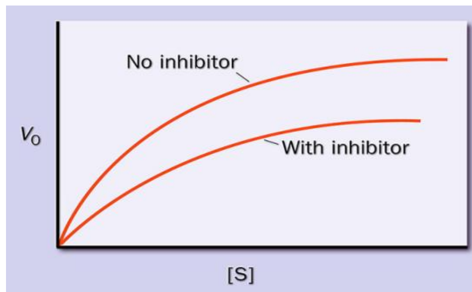
עקומה ליניארית:

ניתן לראות ששני הגרפים חוצים את ציר ה-Y באותה נקודה- כלומר Vmax לא השתנה. אבל משתנה Km- שינוי בנקודת החיתוך עם ציר X ← **ערך Km עולה בתלות ישירה בריכוז המעכב**- ככל שיהיה יותר מעכב אז Km עולה יותר, **ובתלות הפוכה באפיניות של המעכב אל האנזים.**

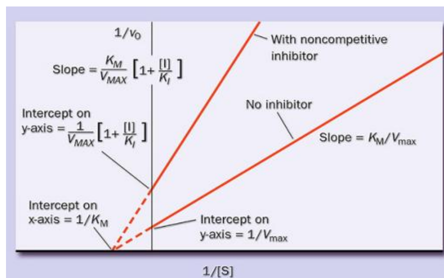
חשוב לציין כי הקומפלקס מעכב-אנזים נמצא בפירוק ובנייה תמידי, ולא נשאר כקומפלקס קבוע.



2. **<u>מעכב לא תחרותי</u> (non-competetive):**
נקשר אל האנזים באתר שונה מאשר אתר הקשירה של הסובסטרט. הקישור לאנזים גורם לשינוי מבני באנזים המונע את הריאקציה הקטליטית אך אינו מונע את קישור הסובסטרט. בניגוד למעכב תחרותי, נוצר קומפלקס משולש של אנזים-סובסטרט-מעכב. הקומפלקס המשולש אינו יכול לעבור את השלב הקטליטי. עיכוב זה, לא משפיע על Km כי הוא אינו משפיע על אתר הקישור. אבל כן משפיע על Vmax, כי זה לא משנה כמה סובסטרט נוסיף תמיד יהיה פחות ES ולכן ה-Vmax נמוך יותר.

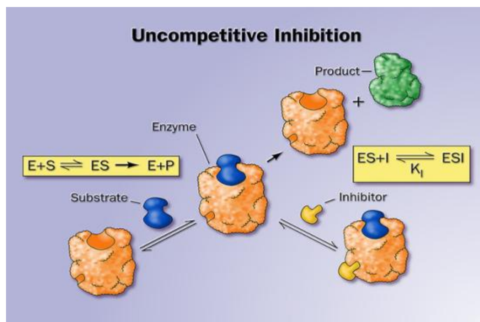


איך מעכב כזה מתנהג מבחינת מיכאליס מנטן?
Km המבטא את ריכוז הסובסטרט במהירות חצי מהמקסימלית הוא זהה אבל ה-Vmax נמוך יותר.

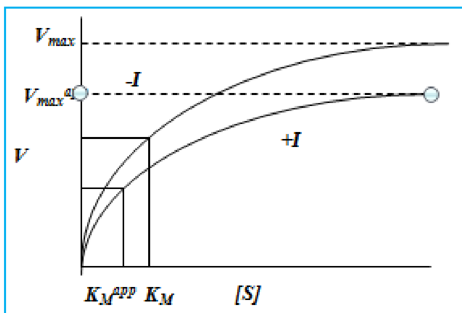


עקומה ליניארית: מעכב לא תחרותי ישפיע על Vmax ולכן נקודות החיתוך שלו עם ציר Y יותר גבוהה ואילו Km אינו מושפע ולכן הם יחתכו את ציר X באותה נקודה. ככל שהאפיניות של המעכב אל האנזים יותר גבוהה כך **Vmax** יהיה קטן יותר ולכן היא **תלויה בריכוז הישיר של I ובריכוז ההפוך ל-Ki.**

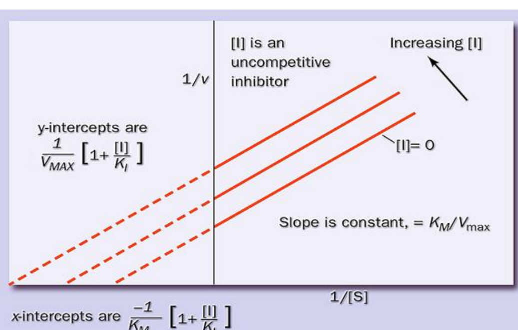
- בטבע ישנם מצבי ביניים: מעכב שנקשר לאתר שונה מהסובסטרט אבל הוא מעכב באופן עקיף את אפיניות הסובסטרט אל האנזים ויכול לעכב את השלב הקטליטי. משנה את מבנה האנזים באופן שישפיע גם על הקישור וגם על השלב הקטליטי- העיכוב אינו חד משמעי אלא **<u>מיקס אינהיבישן</u>**- מעכב גם שלב קטליטי וגם קישור של סובסטרט- מצבים מסובכים בהם לא נעסוק.



3. **<u>מעכב Uncompetitive</u>:**
בניגוד למעכב הלא תחרותי (non-competetive) יודע להיקשר לאנזים רק כאשר יש סובסטרט שכבר קשור אליו. בדר"כ הוא מזהה מבנה כלשהו בין האנזים לסובסטרט ונקשר אליו כך שרק לאחר הקישור בין האנזים לסובסטרט המעכב יודע להיקשר. מקבלים קומפלקס משולש- אנזים-סובסטרט- מעכב.
השפעה מעורבת:
משפיע על Km וגם על Vmax- כאשר יש מעכב יווצר קומפלקס ESI ויהיה פחות ES שיכול לעבור את השלב הקטליטי ולכן **Vmax יורד.**



מולקולות של אנזים סובסטרט נכנסות לריאקציה על מנת ליצור קומפלקס משולש- נעלם מהמערכת ES והופך ל-ESI, יש צורך בעוד ES שייווצר, כל שיווי המשוקל מוטה ליצירת עוד קומפלקס אנזים סובסטרט. יש פחות ES ולכן גם **Km ישתנה ויהיה נמוך יותר.**
עקומות ישרות: הריאקציות יהיו בעלות אותו שיפוע אבל נקודת חיתוך עם ציר Y גבוהה יותר.



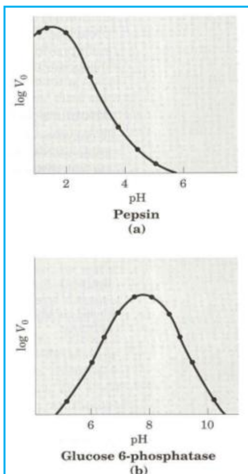
<u>עיכוב בלתי הפיך:</u>

טוקסינים, רעלנים טבעיים או מלאכותיים.

לרב, לחומרים המעכבים מצב ביניים טטרהדרלי דומה לזה של האנזים סובטרט ולכן נקשרים לאנזים באפיניות גבוהה.

- DFP חודר לאתר הפעיל של האנזים אצטיל כולין אסטראז. יש לו אטום פלואור שיוצר קשר קוולנטי עם קבוצת הצד של סרין, זה חוסם את האתר הפעיל. הטוקסין נקשר ואינו משתחרר וכך הורס את האנזים שהופך ללא קיים מבחינת פעילות, עיכוב בלתי הפיך.
- סרין- ידוע כגז עצבים, נקשר לתוך האתר הפעיל של האנזים אצטיל כולין אסטראז ויוצר קשר קוולנטי עם סרין באתר הפעיל של האנזים וכתוצאה מכך בולם את המעבר הסינפטי בין עצבים ← מוביל למוות.
- TPCK מעכב את כימוטריפסין- קבוצת פניל במבנה שלו מאפשרת התאמה לאתר הפעיל. TPCK נקשר לאתר הפעיל של כימוטריפסין ← מציב את הכלוריד כך שיצור קשר קוולנטי עם היסטידין החשובה לריאקציה האנזימטית.
- פרטיון- מעכב אצטיל כולין אסטרז של חרקים ולכן הוא דרך להילחם בחרקים.
- פניצילין (מעכב טבעי)- מעכב בלתי הפיך שנקשר לאנזים הבקטריאלי גליקופפטיד טרנס פפטידאז, אנזים שיוצר קשרים בין סוכרים על גבי דופן החיידק. חיידקים תלויים בדופן, אם אנו מעכבים את האזנים החיידקים אינם עמידים. העיכוב שלו הוא עיכוב קוולנטי של האנזים החיידקי כמו של כל המעכבים הנ"ל. מיוצר על ידי פניציליום- פטריה הנלחמת בחיידקים.

<u>פעילות אנזימתית מושפעת על ידי pH</u>



pH שונה משנה את היינון של קבוצות חלבוניות וכך משנה את האינטראקציות התוך חלבוניות.

לכל אנזים יש אופטימום, לאנזימים הפועלים בקיבה יש אופטימום ב-pH חומצי כמו זה שבקיבה, כאשר מעלים את ה-pH, האנזים מאבד פעילותו.

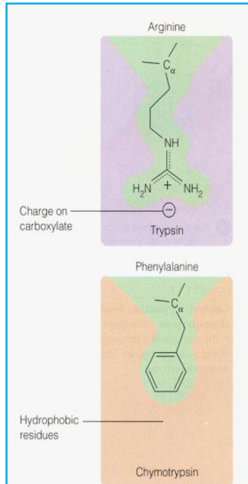
פפסין- אנזים הפועל בקיבה ב-pH נמוך באזור ה-1.6. עקומת הפעמון מראה את פעילות האנזים כתלות ב-pH. האופטימום מבחינת pH מעיד על חומצות האמינו הפעילות בתוך האתר הפעיל. אם האנזים חומצי אז בתוך האתר הפעיל יש קבוצה חומצית כמו אספרטט. ה-pH האופטימלי, יהיה לרב דומה ל-pK של חומצות האמינו הפעילות. פעמים רבות אנזימים משתתפים בריאקציה הכימית כחומצות או בסיסים חלשים, חלק מהפעילות הקטליטית שלהם היא למסור או לקבל מימן. חומצות האימנו המרכיבות את האנזים יכולות לעשות זאת בצורה הטובה ביותר כאשר כאשר הן נמצאות ב-pH שהוא ה-pK שלהן. חומצה אמינית שה-pK של קבוצות הצד של הוא סביב 7 כמו היסטידין, נמצאת באתרים פעילים של אנזימים שה-pH האופטימלי שלהם נמצא באזור 7,8. לכן ניתן ללמוד על חומצות האמינו הפעילות של האנזים באמצעות ה-pH האופטימלי.

<u>דוגמאות למכאניזם של פעילות אנזימתית</u>

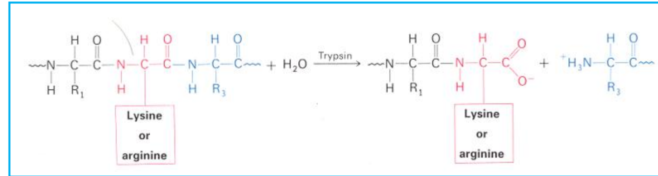
1. <u>סרין פרוטאזות: טריפסין, כימוטרפסין, טרומבין</u>

קבוצה גדולה של אנזימים שעיקרם במערכת העיכול (פעילים בעיכול של חלבונים לפפטידים) ובמערכת קרישת הדם. אנזימים אלו עושים הידרוליזה של הקשר הפפטידי- מכניסים מולקולת מים לתוך הקשר וכך מזרזים את הפירוק שלו. הפעילות הקטליטית, האתר הפעיל, קומפלקס אנזים סובסטרט ומצב המעבר זהים, אך השוני הוא בזיהוי הסובסטרט.

זיהוי סובסטרטים:

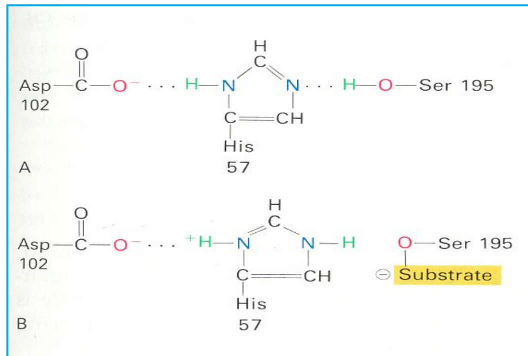


א. טריפסין- מבצע הידרוליזה של קשר פפטידי אחרי ליזין או ארגינין, אלו חומצות אמינו בסיסיות שיש להן מטען חיובי בקבוצת הצד ואותו הוא מזהה. הציור מראה התאמה מבנית בין האנזים לקבוצת הצד. יש התאמה מבנית המאפשרת חדירה של קבוצת הצד לאנזים בצורה נכונה, הסובסטרט מיוצב על ידי אינטראקציות יוניות חשמליות שליליות באתר הפעיל. הקשר הפפטידי מיוצב בצורה כזו שהוא יהיה מול חומצות אמינו היכולות להשתתף בהידרוליזה של הקשר הפפטידי.



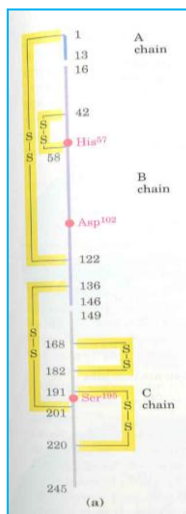
ב. כימוטריפסין- מבקע חומצות אמינו עם קבוצת צד ארומטית, יש הרבה חומצות אמינו הידרופוביות המייצבות את הקישור של קבוצת הצד הארומטית לאתר הפעיל.

כאשר מסתכלים על מבנה מרחבי של אנזימים המצביעים את אותה פעילות קטליטית ניתן לראות דמיון מבני גדול ביניהם. דמיון בהרכב ובמבנה. האתר הפעיל נבנה מאזורים שונים של השרשרת ולכן שרשרת החלבון כולו דומה בכל האנזימים בעלי הפעילות הדומה. במקרה של סרין פרוטאזות יש שלוש חומצות חשובות באתר הפעיל: אספרטט, היסטידין וסרין הנמצאות אחת ליד השנייה. הן לא נמצאות אחת ליד השניה ברצף החלבון אלא כאשר החלבון מתקפל ונוצר אתר קטליטי.



בריאקציה של סרין פרוטאזות:

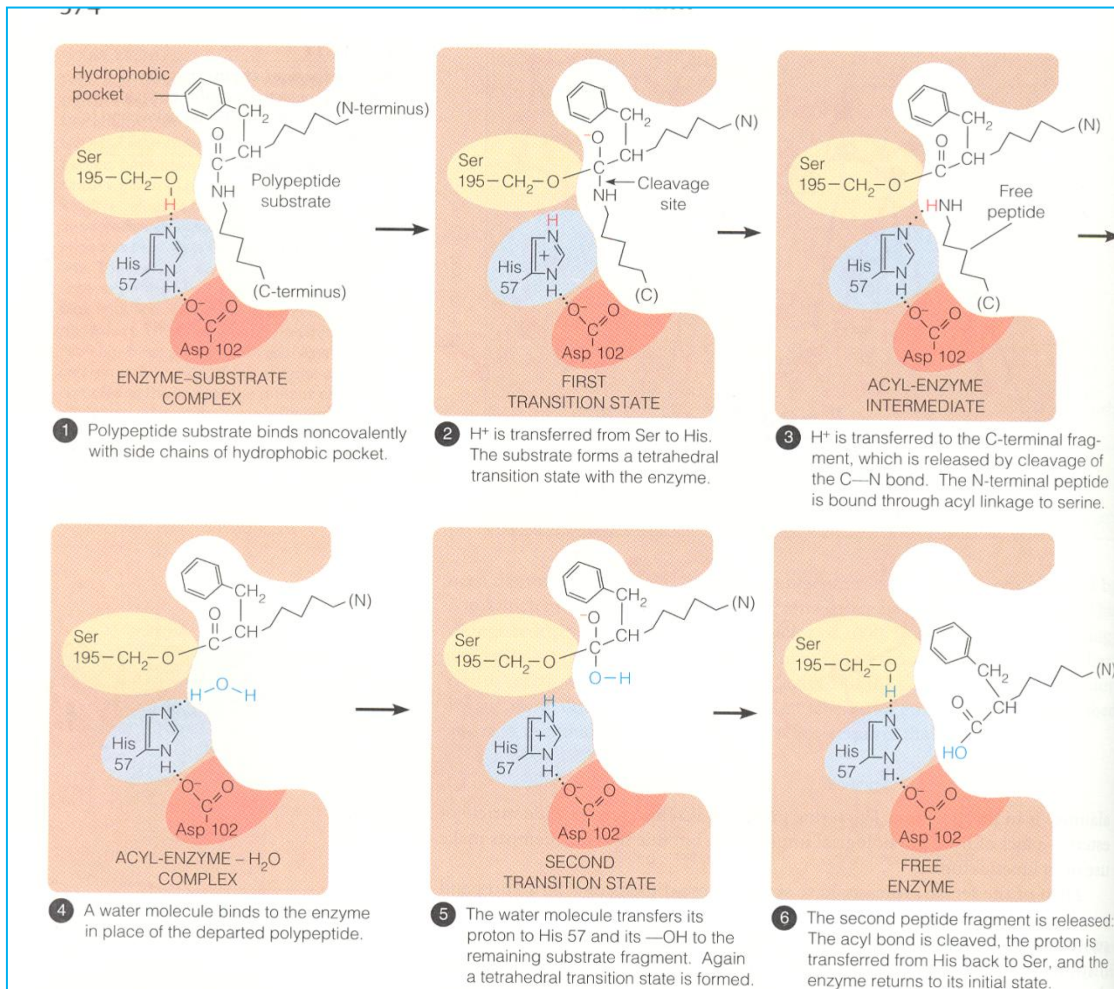
סרין (מסומן כ-195) נמצא ליד היסטידין, היסטידין נמצא ליד אספרטט. סרין מוסר את המימן להיסטידין, דבר שבדר"כ אינו אפשרי אבל כאן הוא אפשרי בגלל שהיסטידין נמצא בסמוך לאספרטט המצוי במצב של CO^- (המטען החיובי מיוצב ע"י המטען השלילי של אספרטט) ← היסטידין מוסר את המימן לאספרטט שלידו. לאחר המסירה, סרין נמצא עם חמצן שקשור לאלקטרונים חופשיים ויכול ליצור קשר קוולנטי עם הסובסטרט. קשר קוולנטי זה אינו יציב .



כימוטריפסין- בנוי משלוש שרשראות פוליפפטידיות (כתוצאה מביקוע פרוטאוליטי). שלוש השרשראות מיוצבות ביניהן גם באמצעות קשרים דיסולפיידים. היסטידין, אספרטט וסרין, שלושת חומצות האמינו החשובות לקטליזה מגיעות מאזורים שונים לגמרי, אפילו משרשראות פוליפפטידיות שונות: היסטידין ואספרטט מגיעות משרשרת פוליפפטידית אחת ואילו סרין משרשרת אחרת. באתר הפעיל הן שלושתן מתקרבות זו לזו. כשמסתכלים על אתר הקישור רואים הרבה חומצות אמינו הידרופוביות, התאמה מבנית מאפשרת קישור מדוייק וחיתוך מדוייק.

<u>שלבים בתהליך ההידרוליזה של קשר פפטידי ע"י כימוטריספין:</u>

(הערה: בריאקציה קטליטית האנזים יסיים כמו שהוא התחיל אבל יכולים להיות שלבי ביניים של יצירת קשר קוולנטי. חשוב לציין- כי השלב הראשון בכל ריאקציה אנזימתית הוא הקישור של הסובסטרט לאתר הקישור, ובהמשך יצירת קשר קוולנטי של הסובסטרט עם האנזים באתר הפעיל).



א. הסובסטרט נקשר בקשר לא קוולנטי באמצעות שרשרת הצד (טבעת בנזן הידרופובית) אל הכיס ההידרופובי של האנזים. הסרין הפעיל יושב מול הפחמן שאיתו יצור את הקשר הקוולנטי.

ב. בגלל הקרבה בין סרין להיסטידין. סרין מוסר את המימן שלו להיסטידין. כעת, סרין יכול ליצור קשר קוולנטי עם פחמן אלפא של הסובסטרט הפוליפפטידי. זהו מצב המעבר הטטראדרלי הראשון של הריאקציה: הפחמן של הסובסטרט קשור לארבעה אטומים מסביבו (אחד מהם שייך לסרין של האנזים). זהו מצב לא יציב כי החמצן טעון שלילית. הוא מיוצב על ידי חומצות אמינו חיוביות. זהו שלב הפיך.

ג. המימן שהועבר מסרין להיסטידין, נמסר על ידי ההיסטידין אל החלק ה-C טרמינלי של הסובסטרט ← הקשר הפפטידי מבוקע ← החלק ה-C טרמינלי של הסובסטרט משתחרר מהאנזים. החלק השני של השרשרת, החלק ה-N טרמינלי, עדיין קשור אל הסרין של האנזים ב-acyl linkage.

ד. מולקולת מים נכנסת לאתר הפעיל במקום הפוליפפטיד שהשתחרר.

ה. מולקולת המים מעבירה את המימן שלה להיסטידין במקום בו ההיסטידין איבד את המימן שלו (לאחר שמסר אותו לפוליפפטיד שבוקע), ואת קבוצת ההידרוקסיל לפחמן האלפא של הסובסטרט שעדיין מחובר לאנזים. נוצר קשר קוולנטי בין פחמן האלפא לקבוצת ההידרוקסיל. זהו מצב טטראידרלי שני, מטען שלילי על החמצן, עדיין לא יציב.

ו. חזרה של הפרוטונים והאנזים למצבם המקורי- ההיסטידין הטעון חיובית מוסר בחזרה את המימן שלו לסרין, זה שובר את הקשר הקוולנטי בין סרין לסטבסטרט והפוליפפטיד משתחרר החוצה.

עקרונות האנזים : אינטראקציה קוולנטית בין האנזים לסובסטרט וקטליזה של חומצה בסיס, האנזים יכול לשמש כחומצה וכבסיס. באנזים הזה, היסטידין מוסר את המימן שלו אל קבוצת NH בשלב מסויים ומשמש כחומצה ובסופו של דבר הוא מקבל את המימן ממולקולת המים כלומר משמש כבסיס.
כתוצאה ממחקרים מבניים (קריסטלוגרפיה) בהם רואים את האטומים ניתן להבין כיצד האנזים מבצע את הקטליזה שלו. אנזים הנקשר לסובסטרט גורם להשריה מבנית, וזה מזרז את הריאקציה הקטליטית.

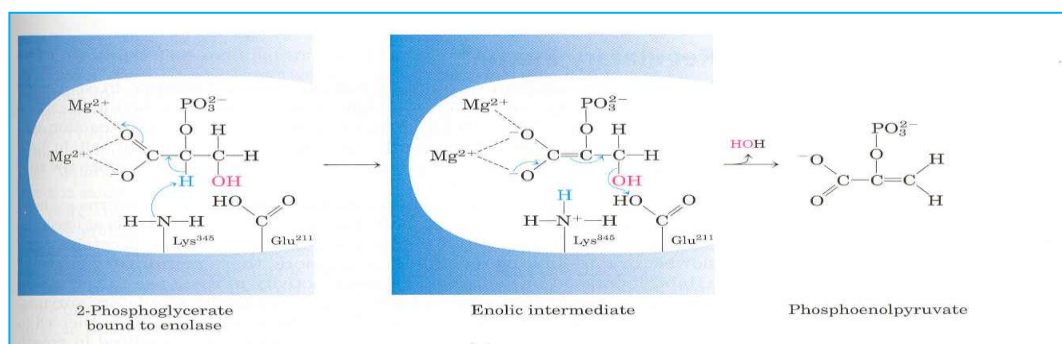
2. __הקסוקינאז:__

אנזים המזרז ריאקציית זרחון של גלוקוז : גלוקוז + ATP ← מתקבל גלוקוז 6 פוספט.
למה האנזים הזה מזרחן אך ורק קבוצת OH של גלוקוז ולא קבוצת OH של מים לדוגמא? למולקולות מים יש נגישות חופשית לאתר הפעיל של האנזים. אז למה מים אינם מזורחנים? אין כמעט טעויות, האנזים כמעט ואינו מזרחן מולי מים לעומת גולקוז שעובר זרחון פי עשר בשישית יותר.
גילוי ההתאמה המבנית נמצא באמצעות __ניסוי :__
ידוע היה שגלוקוז הוא הסובסטרט של האנזים. לקחו סוכר אחר שנקרא קסילוז שהוא סוכר עם 5 פחמנים לעומת גלוקוז שיש לו 6 פחמנים. כאשר קושרים את קסילוז אל הקסוקינאז הוא אינו מזורחן, הוא אמנם מתיישב בתוך האתר הפעיל ונקשר אליו אבל קבוצת OH שצריכה להיות מזורחנת אינה מתייצבת מול האתר הקטליטי או מול ה-ATP שצריך לזרחן אותה. לעומת זאת, כאשר קסילוז נקשר להקסוקיאנז האנזים מתחיל לזרחן OH של מים.
__המסקנה :__
קסילוז נקשר ומשרה את אותו שינוי מבני לו זקוק האנזים על מנת להפעיל את האתר הקטליטי, ברגע שהאתר הקטליטי שינה את מבנהו ויכול לזרחן, מולקולות מים שכן יכולות לחדור לשם, כן מזורחנות.
ישנו **קישור** והוא **משרה שינוי מבני, כתוצאה מכך יש אתר קטליטי שיכול לעבוד** ובמקרה הזה הוא יעבוד על מולקולות מים שיכולות לחדור פנימה ולכן הן מזורחנות.

3. __אנולאז:__

משתתף באחד משלבי הגליקוליזה : מפוספוגליצראט ← מתקבל פוספואנול-פירובאט ומים. באמצעות 2 השלבים המתבצעים על ידי האנזים הזה, נדגים עקרונות קטליטיים נוספים :

א. **Methal ion catalysis -** יוני מתכת בעלי תפקיד בייצוב המבנה ובריאקציה הקטליטית. יונים של מתכות משתלבים במבנה המרחבי של חלבונים בגלל המטענים החיוביים שהם יוצרים, ובזכות יצירת קשרים אלקטרוסטטיים עם חומצות אמינו. במקרה זה, יונים של מגנזיום קשורים בקשרים יוניים לאתר הפעיל של האנזים. המגנזיום בעל המטען החיובי משתתף בקישור הסובסטרט אל האתר הפעיל של האנזים על ידי יצוב החמצנים השליליים של הסובסטרט.



ב. **השתתפות פעילה של האנזים כבסיס או כחומצה-** סובסטרט נקשר לאתר הפעיל ← שרשרת העברת אלקטרונים לכיוון החמצנים ← מימן שמקורו בסובסטרט מועבר אל הליזין של האנזים (האנזים מתפקד כבסיס) ← שרשרת העברת אלקטרונים לכיוון ההפוך ← קבוצת הידרוקסיל משתחררת מהסובסטרט יחד עם מימן המשתחרר מהגלוטמט של האנזים (האנזים מתפקד כחומצה) ← הסובסטרט משתחרר לאחר שאיבד מולי מים.

ואם נסכם:

- אטומי המגנזיום גורמים להעברת אלקטרונים כתוצאה מהאינטראקציות האלקטרוסטטיות- המייצבות מטען חשמלי. בכל המצבים הטטראדרלים הקודמים ישנו ייצוב של חמצן שלילי על ידי חומצה אמינית טעונה חיובית ובמקרה הזה על ידי מגנזיום טעון חיובית.
- עקרון שני הוא שחלוף המימנים בין האנזים לסובסטרט.

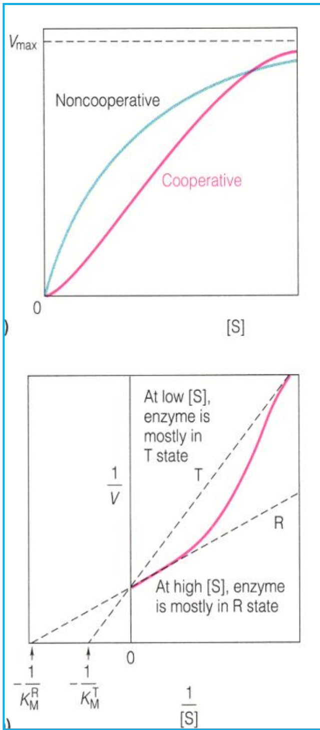
<u>מנגנוני בקרה של אנזימים</u>

פעילות אנזימתית חייבת להתבצע בזמן הנכון ובמקום הנכון. פעילות האנזימים מווסתת ע"י 4 עקרונות:

1. <u>אנזימים אלוסטריים</u>- שונים מהאנזימים המתנהגים לפי מודל מיכאליס מנטן. האנזימים הללו מורכבים ממספר תת יחידות, המוגלובין לדוגמא. המוגלובין אינו אנזים אך עקרון האלוסטריות זהה, יש לו מספר תת יחידות וזה מאפשר שינוי באפיניות האנזים תוך כדי קישור הסובסטרט לאנזים. לאנזימים הללו יש תת יחידות רגולטריות שיכולות לקשור מעכבים או זרזים שמשפיעים על פעילות האנזים ע"י שינוי מבני.
כדוגמא נדבר בהמשך על אספרטאט טרנסקרבמואילז שמשתתף בתהליך הביוסינטזה של פירימידנים בחיידקים.
2. <u>זירוז ועיכוב ע"י חלבוני בקרה</u>- תת יחידות רגולטוריות שאינן חלק אינטגרלי מהאנזים ויכולות להיקשר אל האנזים. למשל, קלמודולין- רגיש לשינויים בריכוזי Ca^{2+} בתוך התא, ומשפעל אנזימים רבים עם עלייה בריכוז הסידן.
3. <u>מודיפיקציות קוולנטיות הפיכות</u>- פוספורילציה של חומצות אמינו מסויימות. הזרחון מזורז בעצמו על ידי אנזימים אחרים ששמם קינאזות, הזרחן מורחק על ידי פוספטאזות. הזרחון משרה שינוי מבני באנזים ויכול לשפעל או לעכב את פעילותו.
4. <u>בקרה פרוטאוליטית</u>- בקרה של אנזימים המסונטזים כפוליפפטידים לא פעילים (במצב זה נקראים זימוגן) ומה שמפעיל אותם הוא ביקוע פרוטאוליטי, חיתוך אחד או יותר של השרשרת הפוליפפטידית ובצורה כזו יצירה של אתר פעיל שלא היה קיים קודם או חשיפה של אתר פעיל שהיה מוחבא. מאפיין בעיקר אנזימים שעובדים מחוץ לתא: אנזימי העיכול ואנזימי קרישת הדם. פועלים מחוץ לתאים כי אינם דורשים ATP. המייחד אותם הוא שהם חד כיווניים, מנגנון השפעול אינו הפיך, אך יחד עם זאת, ניתן לעכב אותם.

<u>1. אנזימים אלוסטריים (אלוסטרי= צורה אחרת):</u>

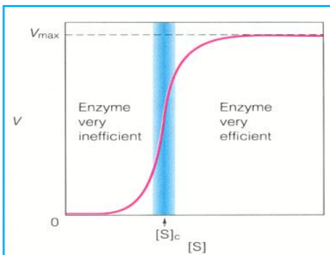
אנזימים עם מספר תת יחידות, לכל תת יחידה אתר פעיל משלה. אנזים אחד עם מספר אתרי קישור לסובסטרט. אותו אנזים נמצא במספר צורות, יש לו מספר מבנים שונים ולכן נקרא אלוסטרי. כאשר נקשר סובסטרט לאתר קישור אחד הוא משרה שינוי במבנה של אתרי קישור נוספים וכתוצאה מכך האנזים משנה את האפיניות שלו אל הסובסטרט. לכן הקישור הוא קואופרטיבי- מזרז את הריאקציה.



הגדרות:

- הומואלוסטריות- שינוי שקשירת סובסטרט משרה על קישור סובסטרטים אחרים.
- הטרואלוסטריות- השפעה של חלבונים שנקשרים לא לאתר הפעיל- זרזים או מעכבים. נקשרים לאתרים אחרים אבל הקישור שלהם משפיע על קישור הסובסטרט לאנזים.

לפי מיכאליס מנטן- קישור לא קואפורטיבי, נראה עקומה היפרבולית. **באנזימים אלוסטריים יש קישור קואופרטיבי**, העקומה נראית כמו S (סיגמואיד): הקישור בריכוזים נמוכים אינו אפקטיבי אבל **ככל שהריכוזים עולים הקישור הופך ליותר אפקטיבי** ובשני המקרים **בסופו של דבר מגיעים למהירות מקסימלית.**
בגרף האמצעי- ניתן לראות שבריכוזי סובסטרט נמוכים יש אפיניות נמוכה לסובסטרט (Km גבוה), ובריכוזי סובסטרט גבוהים יש לאנזים אפיניות גבוהה (Km נמוך).
הקונפורמציה של הקישור החלש נקראת T state ועם הקשר החזק היא R state.
ניתן לראות זאת בצורה מוגזמת בגרף התחתון- אנזים מאוד לא יעל בריכוזים נמוכים ואז בבת אחת הופך להיות מאוד יעיל- כל הסובסטרט נקשר לכל אתרי הקישור של האנזים.



למה צריך את האנזימים האלוסטריים בתוך התאים?
התאים שומרים הומאוסטזיס ולכן ריכוזי המרכיבים אינם משתנים בצורה קיצונית בתוך התא. זה מתאר מערכת דינמית שכל הזמן נוצר סובסטרט והוא מנוצל על ידי אנזים שפועל עליו. הרעיון הוא שהסובסטרט יגיע לרמה מסויימת ואז ברמה זו האנזים שמטפל בו הופך למאוד יעיל. בגלל היעילות הזו כל הזמן תישמר רמה אחידה של הסובסטרט בתוך התא. הסובסטרט מצטבר ומיד כאשר הוא מגיע לריכוז מסויים כולו מטופל והופך לתוצר. אין תנודתיות גדולה של מגיבים בתוך התא.

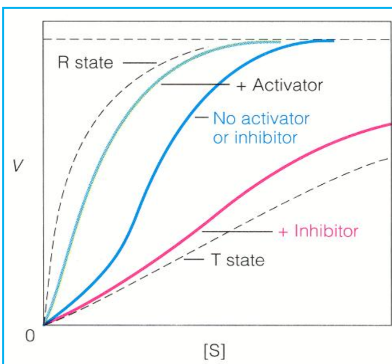
אנחנו משערים שהאנזימים נמצאים בשתי תצורות, או שהם במבנה של אתר פעיל עם אפיניות נמוכה או שהם עוברים שינוי מבני ונמצאים עם אפיניות גבוהה. ניתן להגיד שלאנזימים יש שני Km לסובסטרט. בריכוזים נמוכים Km בעל ערך גבוה יחסית (אפיניות נמוכה). בריכוזים גבוהים לאחר שהאנזים שינה את מבנהו כתוצאה מקישור סובסטרט יהיה לו Km שני. אם מסתכלים על עקומה רציפרוקלית של מיכאליס מנטן שהייתה לינארית לגמרי, נקבל עקמומיות במקרה של אנזימים אלוסטרים- קו שמשתנה. בריכוזים נמוכים ובריכוזים גבוהים של סובסטרט העקומה מקבלת שיפוע אחר ומתקבל Km אחר.

__הטרואלוסטרים:__

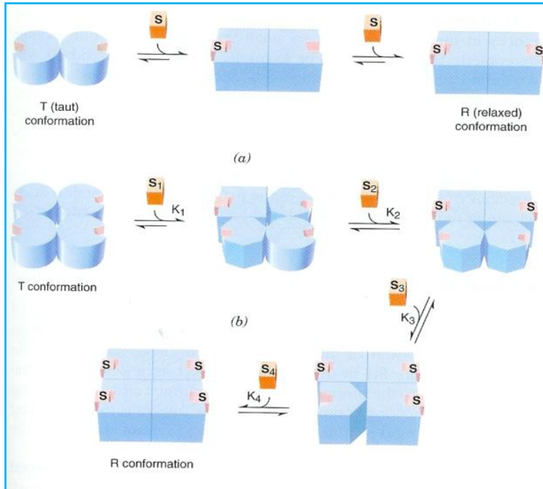
זרזים הנקשרים לאתרים שאינם אתרי הקישור של הסובסטרט. אם אנחנו מניחים שהאנזים נמצא בשתי קונפורמציות בשיווי משקל:

א. T- מבנה שבו האפיניות אל הסובסטרט נמוכה יותר.
ב. R- אפיניות לסובסטרט גבוהה יותר.

זרז- כאשר הוא נקשר אל האנזים הוא מייצב את מבנה R של האנזים ואילו מעכב מייצב את מבנה T של האנזים.
בגרף הסיגמואידי מתוארת התנהגותו של אנזים אלוסטרי ללא מעכב או זרז.



כאשר מוסיפים זרז ← בכל ריכוז המהירות תהיה גבוהה יותר ← זרז מסיט את כל עקומת המהירות שמאלה. ואילו מעכב כיוון שמייצב את המבנה של אפיניות יותר נמוכה מסיט את כל העקומה ימינה. בריכוזי סובסטרט גבוהים בשני המקרים נגיע ל-Vmax. מדובר במעכבים לא תחרותיים ולכן אין הפרעה של קישור של הסובסטרט אלא השפעה על האפיניות. כאשר כל האתרים יהיו מלאים בסובסטרט הוא יגיע למהירות המקסימלית שלו.



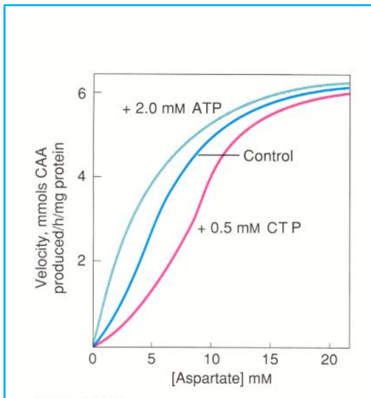
לפי איזה מודל האנזימים עובדים?

א. <u>המודל ההדרגתי (sequential)</u>- שינוי הדרגתי במבנה האנזים, לא שינוי מיידי או כללי.

ב. <u>המודל הסימטרי/מתואם (concerted)</u>- ברגע שנקשר סובסטרט הוא משנה את מבנהו של כל שאר האנזים בצורה טוטלית.

<u>המודל המתואם</u>- אם ניקח אנזים של שתי תת יחידות, כל עוד אינו קושר סובסטרט הוא נמצא במבנה T, כאשר הוא קושר סובסטרט, הקישור גורם לשינוי במבנה שאר תת היחידות- הופכות מ-T ל-R. זהו מודל סימטרי- השינוי הוא שינוי מיידי של כל האנזים, או שכל היחידות במצב T או שכל היחידות במצב R. (בתמונה- העליון).

<u>המודל ההדרגתי</u>- מניח מצבי ביניים, אסימטרי. בהתחלה- כל האנזים נמצא בקונפורמציית T. קישור של סובסטרט אחד לאתר קישור אחד ישנה את המבנה של אותו אתר קישור ויהפוך אותו ל-R, במקביל יש שינוי במבנה של אותן תת יחידות הבאות במגע עם תת היחידה שקשרה את הסובסטרט והן משתנות למבנה ביניים, (עדיין לא למבנה R). מגיע סובסטרט נוסף שקושר תת יחידה נוספת וגם היא הופכת ל-R. תת יחידה נוספת נקשרת וגם היא הופכת ל-R. בסוף הכל משתנה ל-R.



<u>אספרטט טרנסקרבומואילז</u>

מזרז ריאקציה אחת מתוך תהליך של ביוסיטנזת פירימידינים בחיידקים. הוא מהווה שלב ראשון בשרשרת אנזימים שיוצרת פירמידינים: CTP, TTP.
האנזים, מגיב עם קרבמואילפוספט ואספרטט ויוצר קשר קוולנטי ביניהם ומתקבל קארבמואילאספרטאט. התוצר הסופי של אותה שרשרת הוא CTP, והוא מעכב את האנזים הראשון בשרשרת (האנזים האלוסטרי בו אנו עוסקים)- מנגנון של משוב שלילי. פורינים כמו ATP גם הם משפיעים אך בצורה הפוכה- זרזים של פעילות האנזים הראשון.
בנוכחות המעכב CTP- העקומה זזה ימינה. בנוכחות זרז ATP- העקומה זזה שמאלה. האנזים מתנהג כאנזים בעל צורה סיגמואידית ולכן רב יחידתי.

אספרטט טרנסקרבמואילז מכיל תת יחידות קטליטיות ורגולטוריות נפרדות:

ראו שהאנזים מתנהג בצורה סיגמואידית. הוסיפו את החומר הכימי מרקיוריאל (גדול והידרופובי- נקשר לקובצות SH של ציסטאין) וראו שהוא גורם לאנזים לאבד את התכונות האלוסטריות שלו, כלומר יוצר מצב בו אין מנגנון בקרה. האנזים כבר לא יוצר עקומה סיגמואידית אלא עקומה של מיכאליס מנטן= היפרבולי. חומר זה גורם לנטרול השפעתם של זרזים או מעכבים (ATP או CTP), והקישור של הסובסטרט נעשה לא קואופרטיבי. יחד עם זאת, הפעילות האנזימתית המקסימלית לא משתנה.

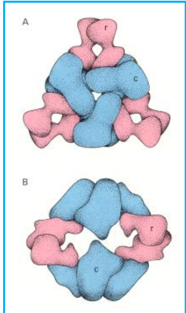
איך זה יכול להיות?

לקחו את האנזים והפרידו אותו באולטרצנטריפוגה (אולטראצנטריפוגה מפרידה חלבונים לפי גודלם וצפיפותם. צפוף יותר- רץ מהר יותר). קיבלו שכאשר האנזים אינו מטופל הוא רץ כפיק אחד- חלבון אחד שניתן לבודד מהצנטריפוגה בעל כל הפעילות של האנזים. לעומת זאת, לאחר טיפול במרקיוריאל מתקבלים שני פיקים : אחד שנודד לאט והשני שנודד מהר. כאשר מפרידים בין שניהם ובודקים היכן הפעילות הקטליטית ניתן לראות שהיא נמצאת בפיק הגדול ואילו הפיק הקטן הוא החלק הרגולטורי. הפרידו בין החלקים הרגולטורים לקטליטים של האנזים וראו שאם מוסיפים ATP או CTP הפעילות הקטליטית של החלק הגדול שרץ מהר אינה מושפעת ואילו החלק הקטן שעושה את הפעילות הרגולטורית קושר CTP/ ATP אל היחידות הרגולטוריות.

מכל האנליזות הללו נקבע שהמבנה הוא :



$$3\,r_2 + 2\,c_3 \longrightarrow r_6c_6$$

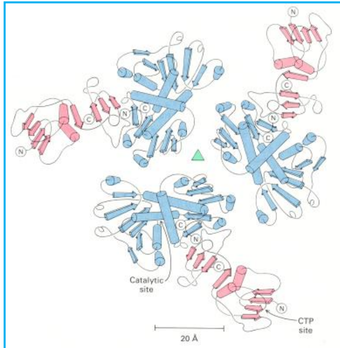


2 מרכזים קטליטיים שכל אחד מהם בנוי משלושה פוליפפטידים ושלושה מרכזים רגולטוריים שכל אחד מהם מורכב משתי שרשראות.

מבט על (תמונה עליונה)- 3 תת יחידות קטליטיות סמוכות ובשוליים- 3 פעמים שתי תת יחידות רגולטוריות.

מבד מהצד (תמונה תחתונה)- מרכז קטליטי למעלה ועוד מרכז קטליטי של שלוש שרשראות למטה.

זהו אנזים אלוסטרי כי מורכב מ-6 תת יחידות קטליטיות שכל אחת קושרת סובסטרט אחד ויחידות רגולטוריות בשוליים המשפעיות עליו, אליהם נקשר מעכב או זרז.

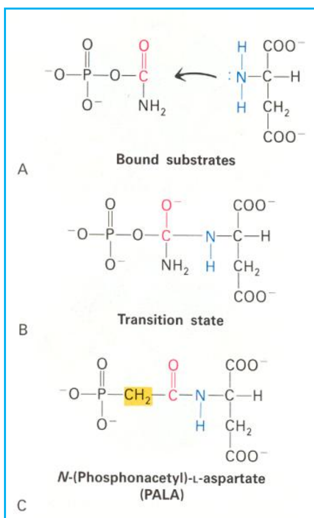


לאחר ביצוע קריסטלוגרפיה בקרני X (תיאור של מבנים שניוניים- אלפא הליקסים ובטא שיט) ראו שבמרכז ישנו חלל ושלוש תת יחידות קרובות אחת לשנייה. האתרים הפעילים מורכבים משתי שרשראות קטליטיות סמוכות. היחידות הרגולטוריות נמצאות בפריפריה וניתן לראות בהם חלוקה לשני דומיינים :

א. פנימי- עובר אינטראקציה עם השרשרת הקטליטית.

ב. חיצוני- מכיל אתר קישור ל-CTP (קישור לזרזים או מעכבים)

מצאו שהזרזים והמעכבים נקשרים לאותו אתר. עוד למדו מהמבנה שכל קבוצה רגולטורית באה במגע עם שתי שרשראות קטליטיות וכל יחידה קטליטית יוצרת אינטראקציה עם שתי יחידות רגולטוריות. הדומיין הפנימי של השרשראות הקטליטיות מכיל יון אבץ. סביב יון האבץ מסודרים ארבעה שיירי ציסטאין. זה מסביר מדוע כאשר מוסיפים את המרכיב הכימי הנקשר לקבוצות SH של ציסטאין זה הורס את מבנה האנזים.

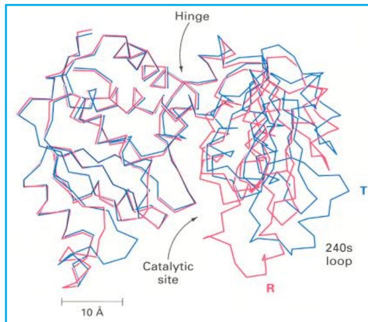


האתר הקטליטי:

בשלב הראשון של הריאקציה הכימית, קבוצת האמינו של אספרטט היא נוקלאופילית ← היא מתקיפה את הפחמן שקשור לחמצן (שקשור לפוספט) ← נוצר קשר קוולנטי ← החמצן טעון במטען שלילי. השלב הראשון הוא יוצר את מצב המעבר הלא יציב. מצבי המעבר הם המצבים בהם האינטראקציה בין האנזים לסובסטרט היא החזקה ביותר. תיכננו במעבדה מרכיב כימי שזהה למצב המעבר של הריאקציה מלבד קבוצת מתיל במקום חמצן- PALA. PALA יכול לשמש כמעכב תחרותי- נקשר לאתר הפעיל באפיניות גבוהה אבל הריאקציה הקטליטית נתקעת ואינה ממשיכה בגלל קבוצת המתיל. PALA שימש לצורך מחקרי- כיצד האנזים עושה את הקטליזה על הסובסטרט?

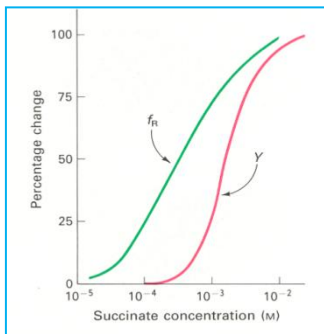
PALA בעל מטענים שליליים רבים ולכן הוא נקשר למספר חומצות אמינו טעונות חיובית באתר הפעיל. הוא יוצר גם הרבה קשרי מימן עם חומצות אמינו באתר הפעיל.
באמצעות PALA למדו שהאתר הפעיל מורכב מחומצות אמינו שמקורן בשתי שרשראות קטליטיות שונות. כמו כן, גילו שהיסטידין מייצב את מצב המעבר : כפי שכבר הוזכר, לאחר שקבוצת האמינו של אספרטט תוקפת את החמצן, הוא נטען במטען שלילי. הצורה המיוננת של היסטידין, בה הוא טעון חיובית, היא המייצבת את המטען השלילי במצב המעבר הזה.

<u>קשירה של סובסטרט או של PALA משרה שינויים מבניים באספרטט טרנסקרבמואילז</u>



ללא מעכב האנזים יותר קומפקטי, שתי היחידות הקטליטיות שנמצאות אחת מעל השנייה יחסית קרובות אחת לשנייה. לעומת זאת, כאשר קושרים את המעכב PALA (או קישור סובסטרט), היחידות מתרחקות אחת מהשנייה. בתמונה ניתן לראות את האתר הפעיל בשתי תצורות : R ו-T. רב השינוי שנעשה בעקבות הקשירה מתבטא בצד ימין למטה : במבנה T- שרשרת שנקראת 240s loop נמצאת רחוק יותר ופתוחה יותר לכניסת סובסטרט. קשירת הסובסטרט משנה את המבנה ← הלופ נכנס פנימה ומקרב אליו את האתר הפעיל.

<u>לפי איזה מודל מבחינה אלוסטרית (סימטרי או הדרגתי) פועל אספרטט טרנסקרבמואילז?</u>



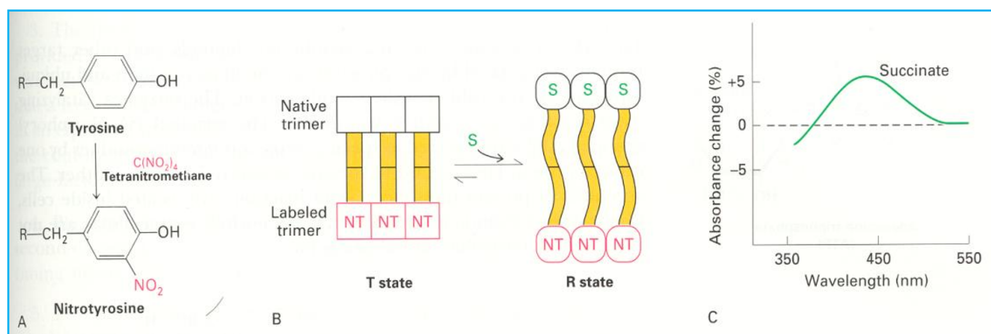
המודל ההדרגתי צופה שהפרקציה של יחידות קטליטיות שנמצאות במצב R תהיה דומה לפרקציה של יחידות שקושרות סובסטרט (T). המודל הסימטרי צופה שהפרקציה שקושרת סובסטרט (T) תהיה קטנה בהרבה מהפרקציה של היחידות שאינן קושרות סובסטרט וכבר שינו את מצבן למצב R. מצאו דרך לבדוק איזה אחוז של תת יחידות נמצא בכל מצב. עקומה משמאל- מתאר את השינוי באחוז התת יחידות העוברת מ-T ל-R. העקומה מימין מתארת את אחוז תת יחידות הקושרות סובסטרט. ניתן לראות כי כבר בריכוזים נמוכים של הסובסטרט הפרקציה במבנה R גבוהה בהרבה מהפרקציה במבנה T, מספיקה תת יחידה אחת קושרת בשביל שכל תת היחידות האחרות יישתנו. ניסוי זה תומך במודל הסימטרי (מתואם) ולא ההדרגתי- השינוי המבני של האנזים מקדים את הקישור לסובסטרט, אחוז גדול יותר של תת יחידות עוברות לתצורת R מאחוז תת היחידות הקושרות את הסובסטרט. במקרה של הדרגתיות היינו צריכים לראות חפיפה כמעט מלאה של שתי העקומות הללו. (הערה : כל אנזים עובד לפי אחד מהמודלים).

נעשו ניסויים נוספים שניסו להוכיח את אלוסטריות האנזים : ניסו להראות שקישור של סובסטרט לתת יחידה מתוך כלל תת היחידות משפיע על הקונפורמציה של אתרי קישור אחרים שאינם קושרים את הסובסטרט. עשו שימוש בשיטות כימיות וגנטיות :

1. באתר הפעיל של האנזים יש חומצות אמינו טירוזין- קשירת ניטרומתאן באופן קוולנטי לחומצות אמינו טירוזין הופכות אותן לניטרוטירוזין. יחידות ניטרוטירוזין בולעות אור באו״ג של 430 ננומטר. לאחר הקשירה ניתן למדוד שינויים המתרחשים באתר הפעיל של האנזים באמצעות מדידת כמות הבליעה של אור באו״ג 430 ננומטר.
2. שינוי גנטי- שינו יחידת ליזין שנמצאת גם היא באתר הפעיל וחשובה לקישור הסובסטרט לחומצה אמינית אחרת וכך מנעו מתת היחידות המוטנטיות (לדוגמא אנלין) לקשור סובסטרט.

- רקונסטיטוציה של האנזים- עירבוב תת יחידות שונות של האנזים על מנת שאלו יצרו את האנזים השלם (למשל תת יחידות מוטנטיות אשר לא קושרות סובסטרט ותת יחידות תקינות).

<u>ניסוי מספר 1</u>:



רקונסטיטוציה: 50% יחידות שבהן הייתה מוטציה לליזין וניטרוטירוזין עורבבו עם 50% יחידות שלא עברו שינוי. התקבל אנזים קימרי- מורכב מתת יחידות רגילות ותת יחידות שעברו שינוי. סובסטרט ייקשר רק לתת היחידות שלא עברו שינוי.

מהלך הניסוי:

מודדים את הבליעה ב-430 ננומטר.

תוצאות הניסוי:

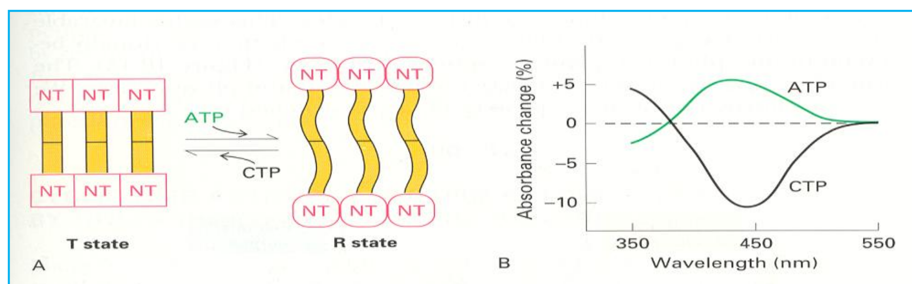
הייתה עלייה בבליעה באו"ג 430 ננומטר.

כלומר היה שינוי באתר הפעיל, אנחנו לא יכולים לדעת מה היה השינוי.

מסקנה:

מעיד על כך שקישור סובסטרט לתת יחידות רגילות (אתרים קושרים סובסטרט) משפיע על קישור סובסטרט לתת יחידות שאינן יכולות לקשור סובסטרט.

<u>ניסוי מספר 2</u>:



רקונסטיטוציה: אנזימים המורכבים מ-100% תת יחידות שעברו את השינוי.

מהלך הניסוי:

הוסיפו ATP או CTP (ATP מזרז אלוסטרי של האנזים- גורם לשינוי קונפורמטיבי של תת היחידות מ-T ל-R. CTP מייצב את קונפורמציות ה-T של האפיניות הנמוכה).

תוצאות הניסוי:

- **ATP-** יותר בליעה ב-430 ננומטר- אותו שינוי שראו כאשר הוסיפו את הסובסטרט. מרמז על כך ש-ATP וגם הסובסטרט יוצרים שינוי דומה- הפיכת האתר הפעיל לאתר פעיל מסוג R- קושר יותר טוב סובסטרט.
- **CTP-** ירידה בבליעה ב-430 ננומטר. גרם לשינוי כללי במבנה האתר הפעיל המייצב קונפורמציה אחרת- קונפורמציית T.

2. פוספורילציה

מנגנון נרחב בבקרת חלבונים בכלל ואנזימים בפרט, זרחון מזורז על ידי קינאזות ומבתצע בחומצות אמינו ובהן OH- סרין, טריאונין וטירוזין. מתקבל מבנה של PO_4 הגורם לשינויים בחלבון- מדוע?

א. מתווספים שני מטענים שליליים לקבוצת הצד והם משתתפים באינטראקציות יוניות עם קבוצות צד של חומצות אמינו אחרות ומביאים לשינוי מבני.

ב. שלושת החמצנים החופשיים יכולים ליצור 3 קשרי מימן עם חומצות אמינו אחרות.

הדברים הללו גורמים לשני אפקטים:

1. שינוי קונפורמטיבי- בעקבות הזרחון החומצה האמינית משתתפת באינטראקציות שקודם לכן לא השתתפה בהן.
2. אינטראקציות חלבון- חלבון- חלק מהבקרה של אנזימים רבים היא אינטראקציה עם חלבון נוסף, זרחון יכול להוות טריגר לאינטראקציה עם חלבונים נוספים המשפיעים על פעילות האנזים.

מנגנון הזרחון הוא הפיך- on-off.

3. אנזימי בקרה- בקרה על ידי יחידות רגולטוריות

דוגמא: PKA- Protein kinase A- אנזים המזרחן חלבונים אחרים. מופעל על ידי cyclic AMP שריכוזו בתא משתנה כתוצאה מסיגנל חיצוני. לאחר קבלת סיגנל חוץ תאי מתרחש תהליך של הפיכת ATP ל-cyclic AMP. cyclic AMP הוא מסנג'ר משני, מעביר בתוך התא את הסיגנל המתקבל מבחוץ וכך הסיגנל מתורגם לשינויים בפעילויות אנזימתיות לדוגמא של האנזים PKA.

כיצד?

במצבו הבלתי פעיל, PKA נמצא בתא בתצורה של שתי תת יחידות קטליטיות ושתי תת יחידות רגולטוריות כאשר התת יחידות הקטליטיות נמצאות בשולי החלבון ואילו הרגולטוריות במרכז. התת יחידה הרגולטורית קושרת בהתאמה מלאה (מנעול ומפתח) את האתר הפעיל הקטליטי וכך חוסמת אותו. תת היחידה הרגולטורית מתחרה עם הסובסטרט- סובסטרט אינו יכול להיכנס כל עוד החלבון נמצא כיחידה אחת. כאשר רמות cyclic AMP עולות הוא נקשר לאתרי קישור ספציפיים עבורו בתת היחידות הרגולטוריות של PKA. אז תת היחידות הרגולטוריות משתחררות מהקטליטיות ותת היחידות הקטליטיות מוכנות לזרחן סובסטרטים. רצף חומצות האמינו באתר הקישור הנמצא בתת היחידות הרגולטוריות וקושר את תת היחידות הקטליטיות: ***Arg-Arg-Gly-Ala-Ile***.

מיוחד בכך שהרצף הזה כמעט זהה לחלוטין לרצף הקישור המצוי על הסובסטרטים של האנזים PKA: ***Arg-Arg-Gly-Ser-Ile***. אלנין היא חומצה אמינית שלא יכולה לעבור זרחון ואילו סרין כן יכולה. ההבדל בין המתחרה הרגולטורי לסובסטרטים הוא יחידת האלנין שהיא סרין בסובסטרטים. השחרור של תת היחידות הרגולטוריות אינו ספונטני משום שהקישור ביניהן לבין היחידות הקטליטיות חזק, הוא נגרם רק בעקבות הקישור של cyclic AMP. המתחרה הוא פסאודוסובסטרט- היחידה הרגולטורית דומה לסובסטרט אך אינה סובסטרט.

4. ביקוע פרוטאוליטי

המכניזם נועד לשפעל אנזימים המסונטזים בצורה שאינה פעילה, זימוגנים, בזמן ובמקום בו התא נדרש להם. הביקוע מתבצע על ידי סרין פרוטאזות. השינוי הנ"ל מתרחש פעם אחת בחיי חלבון- אינו הפיך. ניתן להחזיר את החלבון לצורה לא פעילה רק על ידי חלבונים מעכבים אחרים אך לא ניתן להחזיר את החלבון למצבו המקורי בטרם הביקוע. מנגנון הביקוע מתרחש פעמים רבות באנזימים המופרשים מחוץ לתא משום

שהביקוע יכול להתרחש מחוץ לתא בזכות העובדה שאינו דורש ATP בניגוד לזרחון. מערכות ביולוגיות אשר עושות שימוש בשיטה זו הן:

1. **אנזימים במערכת העיכול:** לבלב וקיבה. יכולים להפעיל אחד את השני:

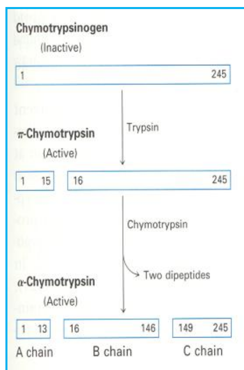
Table 10-1
Gastric and pancreatic zymogens

Site of synthesis	*Zymogen*	*Active enzyme*
Stomach	Pepsinogen	Pepsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase

2. **מערכת קרישת הדם:** המערכת היא שרשרת של אנזימים המבקעים אחד את השני ומעבירים אחד את השני ממצב לא פעיל למצב פעיל. מבטיח תגובה מהירה ומוגברת במצבי טראומה.
3. **הורמונים:** אינסולין- הורמון המופרש בצורתו הלא פעילה- פרואינסולין- וע"י ביקוע פרוטאוליטי מורחק ממנו פפטיד שלם. הרחקת הפפטיד הופכת אותו לאינסולין פעיל. חשוב ביותר בבקרה של רמות סוכר.
4. **קולגן-** חלבון מבני. חלק ממבנה העצמות והעור. מסונטז בצורתו הבלתי פעילה והמסיסה, פרוקולגן. ביקוע פרוטאוליטי מאפשר לו לצאת מהתמיסה וליצור מבנים בהם הוא חשוב.
5. ביקוע פרוטאוליטי של **חלבונים בתהליכים התפתחותיים-** כאשר ראשן עובר מטאמורפוזה מראשן לצורה בוגרת של צפרדע- כל זנב הראשן נעכל על ידי תהליך פרוטאוליטי של עיכול חלבוני הקולגן.
6. **קאספאזות-** חלבונים המובילים לאפופטוזיס. הקאספאזות מופעלות על ידי ביקוע פרוטאוליטי. קאספאז אחד מבקע את זה שאחריו וכך מפעילים אחד את השני עד להובלה לאפופטוזיס.

דוגמאות לאנזימים חשובים במערכת העיכול:

א. כימוטריפסינוגן:



מסונטז בלבלב בצורתו הלא פעילה כי ברגע שהוא מופעל הוא יכול לגרום לנזק עצום בעיקר בתאים ולכן צריך להיות מופרש בטרם מופעל. פועל במעי הדק. מאוכסן בלבלב בוזיקולות (גרנולות) השומרות עליו עד שמתקבל סיגנל הורמונלי המורה לגרנולות לעבור איחוי עם ממברנת התאים ולשפוך את תוכנן למעי. ברגע שהאנזים פוגש את תוכן המעי הוא מופעל. אנזים של 245 חומצות אמינו בצורתו הלא פעילה. כאשר מגיע אל המעי עובר ביקוע ראשון על ידי טריפסין ← מתקבל פאי כימוטריפסין. מתרחש בין חומצות אמינו ארגינין 15 לאיזולואוצין 16 (טריפסין מבקע אחרי חומצות אמינו בסיסיות ולכן אחרי ארגינין). שתי היחידות החדשות שנוצרו אמנם אינן קשורות אך הן נשארות צמודות זו לזו. הביקוע הראשון גורם לשפעול הכימוטריפסינוגן אך אין זו צורתו הסופית. פאי כימוטריפסין עובד על מולקולות פאי כימוטריפסין אחרות ומבקע בהן קשרים נוספים- ביקוע שגורם להתנתקות של שני די פפטידים:

- ביקוע בין 13 ל-16 גורם ליציאת פפטיד 1.
- ביקוע בין 146 ל-149 גורם ליציאת פפטיד 2.

מתקבל הכימוטריפסין הפעיל- אלפא כימוטריפסין: בנוי משלוש שרשראות המחוברות ביניהן בקשרי SS ובאינטראקציות חלשות המייצבות את המבנה.

כיצד הביקוע גורם להפעלת האנזים?
התשובה התקבלה באמצעות הסתכלות על מבנה החלבון הלא פעיל לעומת החלבון הפעיל. מצאו כי הביקוע חושף קצה N טרמינלי חדש בעמדה 16 (איזולאוצין) ← הקבוצה האמינית החדשה משנה את המבנה שלה וחודרת לתוך פנים החלבון ← יוצרת אינטראקציה אלקטרוסטטית בין הקצה האמינו של האיזלאוצין הנמצא במצב NH_3^+ לבין חומצה אמינית אספרטט 194 בעלת מטען COO^- ← שינויים קונפורמטיביים באתר הפעיל. באזור הקטליטי נמצא כעת את אספרטט 194, סרין 195 והיסטידין 57.
לסיכום- ביקוע של קשר פפטידי אחד גורם לשינוי מבני באתר הפעיל של החלבון ולשיפעולו.

ב. פפסינוגן:

אחד מאנזימי העיכול העיקריים בקיבה. פעילותו נעשית ב-pH הנמוך השורר בקיבה, בערך 2. מסונטז כלא פעיל בתאים שסמוכים לקיבה ומופרש מהם לקיבה. ברגע שהוא מופרש לקיבה משתנה סביבת ה-pH שלו. כאשר מנקים את האנזים במעבדה בצורתו הלא פעילה, ניתן להפעיל אותו רק על ידי העברתו ל-pH נמוך מ-5.
מהו מנגנון הפעלתו של האנזים?
במהלך הפעלת האנזים, כאשר האנזים מועבר ל-pH נמוך מ-5, ישנה הרחקה של סגמנט באורך 44 חומצות אמינו. כאשר הפפטיד מורחק מהאנזים השלם, נחשף האתר הפעיל של האנזים והוא הופך לסרין פרוטאז ומעכל חלבונים בקיבה.
מה הסיבה לכך?
באזור pH=5 קבוצות הצד הקרבוקסיליות COO^- של חומצות אמינו חומציות מיוננות. מכאן שמתחת ל-pH=5 קבוצות הצד הקרבוקסיליות של חומצות אמינו חומציות יהיו ניטרליות : COOH. הפפטיד בעל מספר חומצות אמינו טעונות חיובית (בעלות קבוצת צד +NH3) והן עוברות אינטראקציות עם חומצות אמינו שנמצאות בשאר האנזים וכך ומייצבות את האנזים. ברגע שירדנו מערך ה-pH=5 ← מתווספים יוני מימן לקבוצות -COO ← נשברים הקשרים בין הקבוצות האמיניות לקרביקסיליות. <u>בתוך האתר הפעיל</u> של האנזים ישנה אינטראקציה חזקה בין ליזין לשתי יחידות אספרטט, הליזין חוסם את האתר הפעיל. ברגע שהקשר בין האספרטט לליזין נשבר הודות לירידה ברמת ה-pH, האתר הפעיל משתחרר והאנזים מבקע את עצמו (מבקע קשר סמוך לו בשרשרת הפוליפפטידית) וכך משחרר סגמנט באורך 44 חומצות אמינו ומפעיל את האנזים. זהו מנגנון ביקוע עצמי : מולקולה מבקעת את עצמה (שלא כמו בכימוטריפסין). מנגנון הביקוע העצמי התגלה במעבדה כאשר הבחינו שבמבחנה מהירות הריאקציה אינה תלויה בריכוז האנזים.
<u>ריאקציה מסדר אפס-</u> אינה תלויה בריכוזי המרכיבים : בכל ריכוז האנזים מבצע את פעילותו ומבקע משום שהוא מבקע את עצמו בתנאי שהוא נמצא ברמת ה-pH הנכונה.

<u>בקרת האנזימים הפרוטאוליטים- מעכבים</u>

א. <u>מעכב של טריפסין- pancreatic trypsin inhibitor :</u>
אינהיביטור חזק של טריפסין מכיוון שהקישור שלו לאתר הפעיל של טריפסין הוא בלתי הפיך. האפיניות של המעכב אל הטריפסין נמדדת ביחידות של 0.1pM- אפיניות מבין הגבוהות שנמצאו בטבע, קישור וזיהוי של המעכב לטריפסין בריכוזים נמוכים מאוד של 10 בחזקת 13- מולר. המעכב אינו גורם לשינוי במבנה הטריספין אלא מתאים לטריפסין בהתאמה מבנית של 100% וכך נוצרים קשרים רבים ויציבים. טריפסין יכול לבקע קשר פפטידי במעכב (בין ליזין 15 לאלאנין 16), אך זה מתרחש במהירות איטית ולא יעילה. ולכן זמן מחצית החיים של הקומפלקס הוא מספר חודשים (מעיד על יציבות גדולה מאוד), המשמעות היא שבאופן מעשי טריפסין והמעכב אינם נפרדים לעולם.

מדוע אנו זקוקים למעכב חזק שכזה?
מניעת טעויות- המעכב נמצא בלבלב, מקום הסינטוז של טריפסין ואינו מאפשר טעות שתגרום להפעלתו של טריפסין בלבלב עצמו. טריפסין משפעל טריפסינים נוספים שמשפעלים זה את זה בשרשרת, כך יכולים לגרום להרס הרקמה.
Acute pancreatitis- מחלה ממנה סובלים אנשים שיש להם חוסר במעכבים של טריפסין, הלבלב נפגע כתוצאה מהפעלה לא רצויה של טריפסין.

ב. alpha- antitrypsin :

המעכב מיוצר בכבד ומופרש ממנו אל הדם. מזהה ומעכב טריפסין, אך פעילותו העיקרית היא כנגד אלסטאז. אלסטאז הוא אנזים פרוטאוליטי. האלסטאז הוא תוצר של תאים נויטרופילים (תאי דם לבנים).
בזמן פציעה, במצבים אינפלמטוריים כחלק ממנגנון התגובה האימונית מופרש הרבה אלסטאז מנויטרופילים לפלזמה. אבל ישנם מצבים בהם כמויות גדולות של אלסטאז יכולות להוות סכנה לגופנו, לדוגמא אם הוא יבקע חלבונים של רקמות חיבור. רקמת החיבור הרגישה ביותר לאלסטאז היא רקמת הנאדיות בריאות (המדיום החוצץ בין הדם לחמצן בריאות).
ישנן מחלות הקשורות בפעילות יתר של אלסטאז :
Emphysema- מחלה בה כתוצאה מחוסר במעכב alpha-antitrypsin האלסטאז מגיע לריאות בצורה פעילה והורס את רקמת הריאות, מובילה לקשיי נשימה חמורים, והחולים בה זקוקים לאספקת חמצן קבועה.
ניתן לחלות במחלה בשתי דרכים :

- מחלה גנטית- מוטציה המונעת את הפרשת המעכב מהכבד אל הפלזמה, מוטציה בה ליזין מספר 53 במעכב הופך לגלוטמט. אנשים הומוזיגוטים למוטציה חולים במחלת האמפזימה.
- עישון- אנשים מעשנים שהם הטרוזיגוטים למוטציה של ליזין 53. פגיעה בהפרשה אל הפלזמה בשילוב עם עישון מובילים למחלה. עישון הוא גורם חמצון חזק בריאות, הוא מחמצן את מתיונין בעמדה 358 (שותפה באתר הפעיל של המעכב), חמצונה מוביל לקשר כפול בין S ל-O. מצב זה פוגע בקישור בין המעכב לבין האלסטאז.

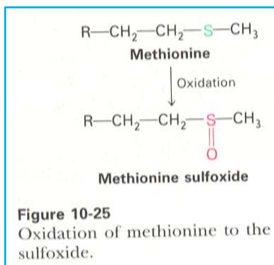


Figure 10-25
Oxidation of methionine to the sulfoxide.

הפעלה פרוטאוליטית של אנזימים- מנגנון קרישת הדם

תהליך קרישת הדם מתרחש בפלזמה, מחוץ לתאים ומטרתו ליצור תגובה מהירה ומדוייקת לפציעה.
שרשרת של אנזימים בה כל אנזים נמצא במצב לא פעיל, עובר ביקוע והופך לפעיל. כל אנזים פועל על האנזים שבא אחריו בשרשרת.
מדוע? אמפליפיקציה- תגובה מהירה ומסיבית. מתחילים ממעט אנזימים ומגיעים מהר מאוד לתגובה אנזימתית מאוד נרחבת. שני מסלולי תגובה לפציעה :

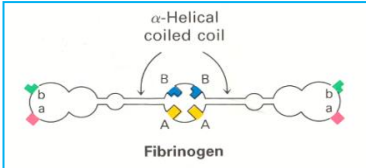
- המסלול האינטרינזי.
- המסלול האקסטרינזי.

על מנת לקבל תגובה מלאה של קרישת דם ישנה הפעלה של שני המסלולים במקביל.
כל אחד מהם מופעל מסיבות שונות.

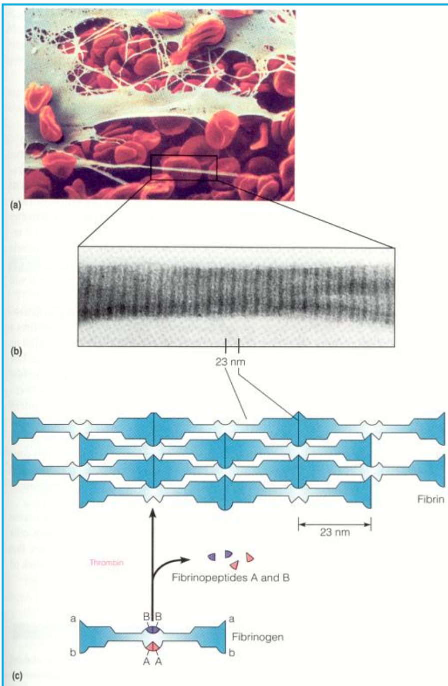
- המסלול האינטרינזי- עצם הפגיעה בתאי האנדותל של כלי הדם יוצרת משטח טעון אניונית וזה גורם להתחלת המסלול.

- המסלול האקסטרינזי- כתוצאה מטראומה ברקמה ישנה הפרשה של פקטורי גידול מהרקמה עצמה, והם מפעילים את המסלול האקסטרינזי.

שני המסלולים מתאחדים בסופו של דבר למסלול אחד והתוצאה הסופית היא יצירת קריש הדם הנוצר מחלבון הפיברין. חלבון הפיברין גם הוא מופעל על ידי ביקועים פרוטאוליטים.
בהמופיליה- רק מסלול אחד מאלה נפגע וזה מספיק על מנת לפגוע בקרישת הדם.



השלב האחרון במסלול, הוא הפיכה של חלבון הקרוי פיברינוגן לפיברין. זה נעשה על ידי ביקוע שעושה חלבון הטרומבין- סרין פרוטאזה שמהווה חלק מהמסלול.
פיברינוגן הוא חלבון גדול מאוד 340KD, מורכב מ-6 פוליפפטידים שונים : 3 דימרים- 2 אלפא, 2 בטא, 2 גמא. לפיברינוגן שלושה אזורים גלובולרים- שניים בקצוות ואחד במרכז. הם מקושרים ביניהם על ידי מבנה של טריפל הליקס- שלוש שרשראות המסתובבות אחת סביב השנייה.

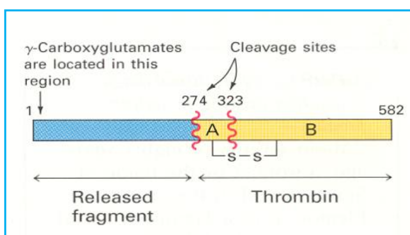


<u>איך מהמונומר נוצר קריש דם?</u>

טרומבין חותך 4 קשרים פפטידים של arg-gly במבנה הגלובולרי המרכזי של פיברינוגן, לטובת שחרור פפטיד A משתי תת יחידות אלפא, ופפטיד B משתי תת יחידות בטא ויצירת מונומר פיברין. הביקוע מתחיל את תהליך יצירת הפולימר בין היחידות של פיברין. יחידות פיברין עוברות אינטראקציה כך ששתי יחידות גלובולריות קיצוניות נקשרות ליחידה גלובולרית מרכזית אחת של פיברין אחר (half staggered array). כך נוצר מבנה הדרגתי כתוצאה מ :

- הרחקת הפפטידים שיוצרת מבנה שמאפשר אינטראקציה בין שרשראות קיצוניות לשרשראות מרכזיות, מבחינה מבנית.
- אינטראקציות יוניות- האזורים הגלובולרים הקיצוניים טעונים בחומצות אמינו חומציות ואילו במרכז, לאחר הרחקת הפפטידים נוצר אזור טעון חיובי- של חומצות אמינו בסיסיות.

הוכחות למבנה ניתן לראות במבט במיקרוסקופ אלקטרונים : מונומרים של פיברין מסתדרים באופן ספונטני למערכים פיברוטיים הקרויים פיברין, במערך הזה ישנם פסים ברוחב של 23 ננומטר בין תת יחידות. גודלה של יחידה אחת הוא 46 ננומטר, כלומר מבנה של חצאי מולקולות היוצרות את הפסים של קריש הדם. מבנה זה אינו מספיק יציב כי הוא מבוסס על אינטראקציות שאינן קוולנטיות. בנוסף למבנה הזה נוצרים קשרי צימוד קוולנטים בין יחידות פיברין שכנות אחת לשנייה. נוצרים קשרי צימוד אמידיים בין חומצת אמינו גלוטמין של מונומר פיברין אחד לליזין הנמצאת על מונומר פיברין סמוך. את יצירת הקשר מזרז אנזים ששמו טרנס גלוטמינאז (פקטור 13) וכך נוצר קריש דם.



<u>טרומבין : האנזים המבצע את הביקוע של הפפטידים מהפיברין :</u>

אנזים שמשקלו 34KD המכיל שתי שרשראות : A ו-B. מסונטז כפרוטרומבין- מולקולה גדולה של 582 חומצות אמינו, ואז עובר שני ביקועים פרוטאוליטים :

- בין חומצות אמינו 274 ל-275. מפריד אותו מהחלק ה-N טרמינלי המקובע לממברנה וכך מאפשר לו להגיע לפלזמה ולעבוד במקום בו השתחרר.
- בין חומצות אמינו 323 ל-324. ביקוע זהה לביקוע בכימוטריפסין - חושף קצה

N טרמינלי חדש של איזולאוצין והוא מסתדר בצורה אחרת בתוך האנזים וגורם להפעלת האתר הפעיל של האנזים.

מדוע אנו זקוקים לחלק ה-N טרמינלי שלכאורה הוא מיותר ומורחק?

החלק הזה הוא החלק שמביא את האנזים למקום הנכון בו הוא צריך לפעול. כיצד? חשיבות החלק ה-N טרמינלי התגלתה כאשר מצאו שבפרות אם מעכבים את ויטמין K ישנה פגיעה בקרישת הדם. לכן, נבין את תפקיד החלק ה-N טרמינלי בחלבון הפרוטרומבין ע"י הבנת תפקיד ויטמין K בתהליך קרישת הדם.

ויטמין K מהווה תפקיד חשוב בתהליך הקרישה של הדם. כיום ישנם מעכבים הפועלים על עיכוב ויטמין K בהם עושים שימוש בקליניקה על מנת למנוע את קרישת הדם:

- Dicoumarol
- Warfarin.

ויטמין K מבצע קרבוקסילציה (הוספה של קבוצה קרבוקסילית) לגלוטמט ומתקבלת מודיפיקציה ששמה גמא קרבוקסיגלוטמט. התוצאה היא שתי קבוצות קרבוקסיליות טעונות שלילית בגלוטמט (זוהי מודיפקציה ספציפית לתהליך קרישת הדם). בקצה ה-N טרמינלי של פרוטרומבין ישנן 10 חומצות אמינו גלוטמט ברצף והן עוברות את המודיפקציה לקרבוקסיגלוטמט. עובדה זו מאפשרת קלציה (chelation)- יכולת קישור אלקטרוסטטית חזקה בין יחידות הגלוטמט השליליות ליוני הקלציום המרוכזים על ממברנה של תאים מסויימים. הקישור בין הקלציום לקצה ה-N טרמינלי של טרומבין מביא את טרומבין לממברנות התאים בהם הוא צריך לעבוד. כאשר אין את המודיפיקציה, האינטראקציה בין גלוטמט לקלציום הרבה יותר חלשה ולכן טרומבין אינו מגיע למקום הנכון בו עליו להיות מופעל. קיימת חשיבות גבוהה לכך שטרומבין יבצע פעילותו אך ורק במקום הנכון בו הוא דרוש. מהו המקום הנכון? המקום בו מצויים הפקטורים המבצעים את שני הביקועים והופכים אותו מפרוטרומבין לטרומבין:

פקטור 10- סרין פרוטאז.

פקטור 5- אנזים המאקטב את פעילותו.

ממוקמים בממברנה הפלזמתית ורק לאחר שמגיע אליהם יכול להתחיל בפעולתו, אם טרומבין לא יגיע למקום המסויים הזה הוא לא יופעל. לאחר הקלציה לקלציום הוא עובר את הביקוע ושם הוא מתחיל לעבוד על יחידות פיברין ויוצר את קריש הדם. כלומר, זהו תהליך ספציפי לאזורי הפציעה. זו הסיבה לך שבחוסר בויטמין K הטרומבין אינו פעיל.

<u>המופיליה</u>

מחלה שהייתה נפוצה בבית המלוכה האנגלי שהתאפיין בנישואי קרובים. אחוזה בכרומוזום X. הגן המקודד לפקטור 8 חסר או מוטנטי באופן גנטי. פקטור 8 הוא פקטור חשוב בשרשרת קרישת הדם, הוא עצמו אינו סרין פרוטאז אלא אקטיבטור של סרין פרוטאז 9. סרין פרוטאז 9 בעל תפקיד לעכל את סרין פרוטאז 10 ולהפוך אותו לפעיל. מכיוון שהמוטציה אחוזה בכרומוזום המין ישנם יותר גברים החולים במחלה. מספיק שהגבר נשא והוא יהיה חולה. לעומת אישה שצריכה להיות הומוזיגוטית על מנת להיות חולה במחלה. בימינו יודעים להתגבר על המחלה. בעבר היו מרכזים כמויות סרום גדולות מאנשים בריאים ומחברים אנשים חולים לאינפוזיות וכך מספקים להם את החלבון החסר, פקטור 8. כאשר לוקחים סרום מאנשים ניתן להעביר מחלות- בעיקר מחלות ויראליות כמו צהבת, HIV. בימינו, ניתן לבטא את הגן. הגן המקודד לפקטור 8 הוא גן ענקי, 186 אלף בסיסים, מלא באקסונים, החלבון עבר שיבוט בתוך תאי אוגר תחת פרומוטור חזק והוא מופרש החוצה מהתאים למדיום וכך ניתן לרכז אותו ולהזריק אותו לחולי המופיליה. זהו תהליך יותר מבוקר שאינו מלווה בסכנת מחלות.

<u>קרישי דם מפורקים ע"י פלזמין:</u>
אחרי שמערכת הקרישה עובדת ונוצרים קרישי דם צריך לפרק אותם, משום שהם יכולים לנדוד ולסתום כלי דם, כך לגרום לשבץ, התקפי לב ועוד. לכן המערכת היא מערכת הפיכה: לאחר שנוצרו קרישי הדם של הפיברין יוצאת לפועל מערכת הפירוק. פירוק יחידות הפיברין נעשה על ידי פלזמין- סרין פרוטאז החותך את הפיברין לחתיכות קטנות (אינו מאוד ספציפי), מפרק את הפיברינים לפפטידים. מסונטז כפלזמינוגן לא פעיל והחלבון שהופך אותו לפעיל הוא TPA- tissue plasminogen activator. TPA- בעל אתרים שונים המדביקים אותו לקריש הדם, יחידות הפיברין, ושם הוא מבקע את הפלזמינוגן והופך אותו לפלזמין פעיל.

היום ניתן להפיק בשיטות של הנדסה גנטית את TPA ובמקרים של התקפי לב, קרישי דם, ניתן לעשות בו שימוש בקליניקה: להזריק אותו לאדם מיד לאחר התקף לב כאשר קריש דם יוצר חסימה של זרימת דם. תמונות בסוף המצגת: ניתן לראות סתימה באזור הלב ולאחר כמה שעות מרגע הזרקת TPA ניתן לראות שחרור הסתימה וזרימת דם למקום החסום.

ביואנרגטיקה, מטבוליזם ומטבוליזם של פחמימות

<u>מבוא</u>

תהליכים בגוף לא נמצאים בש״מ תרמודינמי. בתהליכים שנמצאים בש״מ, אין מעבר של אנרגיה בין המערכת לסביבה. הגוף שלנו שומר על טמפ׳ קבוע של 37 מעלות, ולכן הוא צריך כל הזמן להחליף אנרגיה עם הסביבה לייצר סביבה קבועה.

מטבוליזם מתייחס לכל סדרת הריאקציות בהן מערכות חיות לוקחות אנרגיה חופשית מהסביבה על מנת לבצע פעולות שונות. תהליך הפוטוסינתזה הוא התהליך המרכזי בו מערכות חיות מתחילות להשיג אנרגיה חופשית.

מקורות לאנרגיה חופשית:

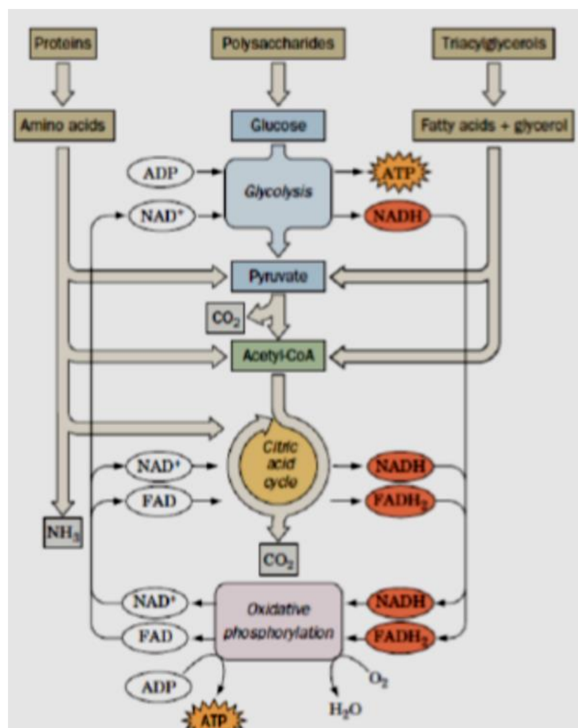
אורגניזמים **אוטוטרופים** הם כאלו שיכולים להפיק את האנרגיה החופשית שלהם בעצמם. הם מתחלקים ל-2:
(א) פוטוטרופים (כולל כמה סוגי צמחים ובקטריות), אשר הופכים את אנרגית השמש לפחמימות וחמצן; (ב) כמוליטוטרופים, שמחמצנים תרכובות אי אורגניות להשיג אנרגיה.

אורגניזמים **כימוטרופים** משיגים אנרגיה חופשית על ידי חמצון של תרכובות אורגניות שהשיגו מהמזון. הם מתחלקים ל-2:
(א) יצורים אנ-אירובים, שמשתמשים במחמצנים כמו סולפיט וניטרט; ו-(ב) יצורים אירובים, שמשתמשים בחמצן כמחמצן.
אנו נתמקד ביצורים כימוטרופים שעושים חמצון אירובי.



ריאקציות מטבוליות נחלקות לקטבוליזם ואנבוליזם. **קטבוליזם** אלו תהליכים של פירוק המזון לצורך יצירת מקורות אנרגיה או לשימוש באבני הבניין שלהם. **אנבוליזם** זה התהליכים של בניית הגוף מאותה אנרגיה ומאותן אבני בניין.

האתגרים שהגוף צריך להתמודד איתם בהפקת אנרגיה וניצולה הם תחילה שהוא צריך למצוא דרך להפיק אנרגיה ממקורות מזון שונים (חלבונים/פחמימות/שומנים), ואז הוא צריך לדעת לאגור את האנרגיה באופן שיהיה זמין בעת הצורך.
הדרך לאחסן אנרגיה ברוב המערכות החיות היא במולקולת ATP ו-NADPH. אלו מולקולה עתירות באנרגיה, משקיעים אנרגיה ליצור את הקשרים בהן, ואז בפירוקן משתחררת אנרגיה שניתן לנצל לתהליכים שונים של ביוסינתזה.



קטבוליזם-סקירה כללית

המערכת צריכה להתמודד עם הרבה סוגים של מקורות מזון: חלבונים, שומנים, פחמימות. הגוף מפרק את כולם לתוצר ביניים אחד-אצטיל קו-A. זה מאפשר שימוש במערכת אחת שתתמודד עם כל תוצרי הפירוק של המזון. אצטיל קו-A נכנס למעגל קרבס, שם הוא יעברו חמצון. בשני התהליכים הללו יווצרו מולקולות NADH ו-$FADH_2$, שיוכנסו לשרשרת מעבר אלקטרונים ולמעגל נוסף של oxidative phosphorylation, בהם יווצר ה-ATP. זו דרך תכנון של משפך או צוואר בקבוק, שחוסך צורך במערכות שונות כדי להתמודד עם המון מקורות מזון.

עקרון נוסף של מטבוליזם הוא שתהליכים שונים קורים במקומות שונים בתא. למשל, תהליך הגליקוליזה מתרחש בציטופלסמה, ואילו מעגל קרבס, שרשרת מעבר האלקטרונים וזרחון חמצני מתרחשים במיטוכונדריה. מתוך זה, יוצא שהאצטיל קו-A צריך להיכנס למיטוכונדריה. זה הרבה יותר פשוט להמציא מנגנון אחד שיכניס אצטיל קו-A לתוך המיטוכונדריה מאשר להמציא הרבה מערכות שונות שיכניסו תוצרי פירוק שונים. זו הסיבה שאותו צוואר בקבוק התפתח באבולוציה.

תהליכים של הפקת אנרגיה בגוף הם מאוד מבוקרים. הבקרה היא על ידי אנזימים. האנזימים ממלאים תפקיד קריטי בשפעול של תהליכים. מאחר ויש להם ספציפיות מאוד גבוהה, וזה מאפשר גם בקרה על תהליכים ממוקדים. כמו כן, הן מאפשרים צימוד בין ריאקציות שאחת מהן היא לא מועדפת אנרגטית והשנייה כן, וכך ניתן להוציא לפועל תגובות שלולא הצימוד לא היו מתרחשות.

אנזימים מעורבים בארבע סוגי ריאקציות עיקרית: חמצון-חיזור (אלו הן האוקסירדוקטזות), העברת קבוצות ממקום אחד במולקולות למקום אחר (טרנספרזות והידרולאזות), ארגון קבוצות (איזומרזות ומוטזאות) ושבירת קשרי פחמן (הידרולזאות, ליגזות, ליאזות).

במנוחה, האנרגיה הנצרכת בגוף היא ביום היא כ-2000 קילוקלוריות. זה הספק של 72-96 וואט ליום. לשם השוואה, נורת ליבון רגילה היא בעלת הספק של 60 וואט (וואט=אנרגיה ליחידת זמן. כמה ג'אול נוצל בשנייה). לא ברור מה הפואנטה.

החוקים הכללים של תרמודינמיקה

החוק הראשון של תרמודינמיקה:

אנרגיה היא הכוח שצריך כדי להזיז מסה מסוימת מנקודה א' לנקודה ב'. עבור ריאקציות שמתרחשות בגוף, נוח לחשוב במונחים של חום ולא כוח. החוק הראשון של תרמודינמיקה אומר כי במערכת סגורה האנרגיה נשמרת, על ידי תחלופה של חום ועבודה בין המערכת לסביבה: $\Delta E = \Delta Q - \Delta W$. [ΔE=שינוי באנרגיה (מסומן גם כ- U), ΔQ=חום שנמסר למערכת, ΔW=עבודה שנעשתה על ידי המערכת]. חוק זה תקף רק למערכת סגורה.

חוק זה לא מעיד על כיווניות של תהליך- יש תהליכים ספונטנים אקסותרמים בהם האנרגיה יורדת, ויש תהליכים ספונטנים אנדותרמים בהם האנרגיה עולה.

החוק השני של תרמודינמיקה:

הכיוון הספונטני של תהליך הוא כזה שמגדיל את האנטרופיה- אי הסדר ביקום.

אנטרופיה היא מדד לאי סדר במערכת. ההגדרה המדויקת של אנטרופיה לקוחה ממכניקה סטטיסטית:

$$S = k_B \log(\Omega)$$

כאשר אומגה היא מספר המצבים בהם ניתן לסדר את המולקולות במערכת. האטרופיה היא פורפורציונלית למספר המצבים- ככל שהוא יותר גדול, האנטרופיה גדלה.

החוק השני של תרמודינמיקה קובע כי בתהליכים ספונטניים, האנטרופיה של היקום עולה או נשארת קבועה.

אנרגיה חופשית:

קשה לחשב את אי הסדר של היקום פר כל תהליך, ולכן חיפשו מדד שיעיד על ספונטניות רק מתוך התבוננות בתהליך- וזוהי **אנרגיה חופשית**.

כדי להבין אותה נגדיר את המושג **אנתלפיה**. היא מסומנת כ-H, ומוגדרת: $H = E - PV$.

PV שווה לעבודה שנעשית על מנת לשנות נפח של גז.

במערכות בהן הלחץ קבוע, כמו מערכות ביולוגיות, ההפרש באנתלפיה שווה להפרש בחום: $\Delta H = \Delta Q_p$.

במערכות ביולוגית, הלחץ כאמור קבוע, אבל גם הטמפ'. במערכות עם לחץ קבוע וטמפ' קבועים, ניתן לדעת מתי תגדל האנתלפיה של היקום, וכך לדעת מתי תגובה תהיה ספונטנית. זה יקרה כאשר יהיו יחסים מסוימים בין האנתלפיה, האנטרופיה והטמפ' של התגובה:

ΔH	ΔS	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
-	+	מועדף אנטלפית ואנטרופית. תהליך ספונטני בכל טמפרטורה.
-	-	מועדף אנטלפית אך לא אנטרופית. תהליך ספונטני אם הטמפרטורה *נמוכה* מ: $T = \Delta H / \Delta S$
+	+	לא מועדף אנטלפית אך מועדף אנטרופית. תהליך ספונטני אם הטמפרטורה *גבוהה* מ: $T = \Delta H / \Delta S$
+	-	לא מועדף ואנטרופית. תהליך לא ספונטני בכל טמפרטורה.

תהליכים אקסותרמים שמעלים אנטרופיה יהיו ספונטנים תמיד. תהליכים אנדותרמים שמורידים אנטרופיה יהיו לא ספונטנים תמיד. כאשר האנטלפיה והאנתרופיה הם באותו הסימן, מי שיקבע את כיוון התהליך הוא הטמפרטורה.

כל הגדלים הללו קשורים במושג שנקרא אנרגיה החופשית של גיבס והוא מוגדר כך:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

מתוך החוק השני של תרמודינמיקה נובע שבלחץ וטמפ' קבועים, ריאקציה תהיה ספונטנית אם האנרגיה החופשית תרד ($\Delta G \leq 0$).

בש״מ תרמודינמי אין מעברים של חום וחומר במערכת. התנאי לשיווי משקל בטמפ׳ ולחץ קבועים הוא ש-$\Delta G = 0$.

במצב יציב- הומאוסטזיס, המערכת אינה משתנה לאורך זמן, אבל היא לא בשיווי משקל. כלומר ΔG אינו אפס. במערכת ביולוגית, רוב התהליכים רחוקים מאוד משיווי משקל.

יש קשר בין קבוע שיווי משקל ו-ΔG בתנאים סטנדרטים:
ניתן להסיק אנרגיה סטנדרטית מקבוע ש״מ ולהיפך.

$$Keq = e^{-\Delta G^\circ / RT}$$

<u>אנרגיה חופשית וספונטניות בתהליכים מטבולים</u>

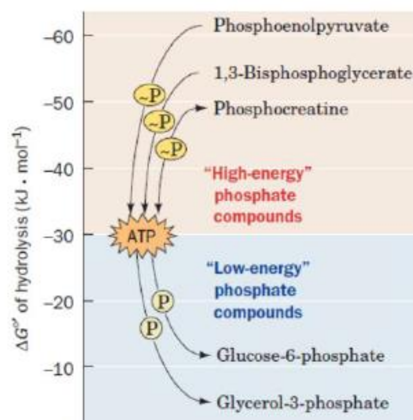
אנזימים ממלאים תפקיד מרכזי בקביעת כיווניות של ריאקציות בגוף.

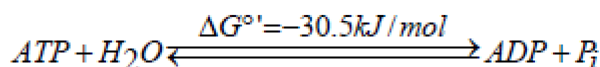
בריאקציות מטבוליות שקרובות לשיווי משקל (ΔG קרוב לאפס), אנזימים משפיעים על כיוון הריאקציה ע״י שינוי של היחס בין המגיבים לתוצרים. למשל על ידי מנגנון של הרחקת התוצר, אפשר כל הזמן להפריע לש״מ ולהסיט את התגובה אל עבר התוצרים.

בריאקציות שמאוד רחוקות משיווי משקל (ΔG רחוק מאפס), שינוי של ריכוז תוצרים ומגיבים לא יעשה השפעה גדולה על כיווניות הריאקציה. ובמקרה הזה צריך מנגנון שמבקר את פעילות האנזים ואת הקצב שלו, על מנת להשפיע על כיווניות הריאקציה.

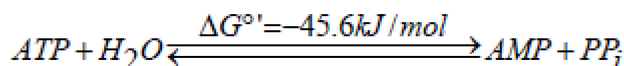
יש שתי דרכים בהם אפשר ל״סחור״ באנרגיה.

דרך אחת היא באמצעות מולקולות עתירות אנרגיה. מולקולת ה-ATP (adenosine triphosphate) היא עשירה באנרגיה. יש לה 3 קבוצות כימיות של פוספריל, וכאשר כל פוספריל עובר ממולקולה אחת לאחרת יש שינוי באנרגיה (מולי׳ אחת תקבל אנרגיה, השנייה תפסיד). הידרוליזה היא תהליך הוצאה של פוספט מ-ATP על ידי הגבתו עם מים. תהליך זה הוא ספונטני ונותן בערך 30 KJ/mol. אפשר להוציא 2 קבוצות פוספריל ולקבל כ-45KJ/mol.





$$ATP + H_2O \overset{\Delta G^{\circ\prime} = -30.5 kJ/mol}{\rightleftharpoons} ADP + P_i$$



$$ATP + H_2O \overset{\Delta G^{\circ\prime} = -45.6 kJ/mol}{\rightleftharpoons} AMP + PP_i$$

באנרגיה הזו אפשר להשתמש לתהליכים אחרים על ידי שרשרת העברות של הפוספט ממולקולת ATP למולקולה אחרת. את זה עושות קינזות. הן יכולות להעביר פוספרילים מעוד מולקולות חוץ מ-ATP, כפי שרואים בציור.

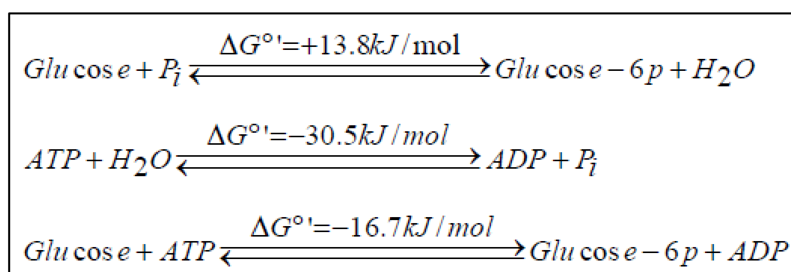
אדם ממוצע צורך בערך 3 מול של ATP בשעה (זה בערך 1.5 ק״ג).

מולקולה אחרת עתירה באנרגיה היא אצטיל קו-A. הקבוצה שעוברת ממנה כדי להפיק אנרגיה היא קבוצת אצטיל. הקשר בין האצטיל לשאר המולקולה הוא קשר תיואסטר, וגם פירוקו נותן בערך 30KJ.
יש עוד קבוצות פונקציונליות שיכולות לעבור כמו קטון ואלדהיד.

צימוד ריאקציות: דרך להפוך ריאקציות מלא ספונטניות לכן ספונטניות. אם לוקחים 2 ריאקציות- האחת עם ΔG שלילי והשנייה עם ΔG חיובי, ומצמדים אותם, סך האנרגיה החופשית יהיה הסכום שלהם, ואם התגובה הספונטנית נותנת בערך מוחלט יותר אנרגיה מזו שצריך בשביל התגובה הלא ספונטנית, הסכום שלהם יהיה שלילי, ונקבל תגובה ספונטנית.

דוגמא היא הזרחון של מולקולת גלוקוז. לתגובה זו יש ΔG= + 13.8. לכן זו תגובה שלא תקרה באופן ספונטני. אם מצמדים אותה להידרוליזה של ATP (ריאקציה עם ΔG= -30KJ), הריאקציה הסופית תהיה בעלת ΔG שלילי, וכך תתרחש ספונטנית.

צריך לזכור שהעובדה שה-ΔG הוא שלילי מבטיח שהתגובה תהיה ספונטנית, אבל זו לא אומר שום דבר בנוגע לקצב של התגובה. יתכן כי מדובר בתגובה עם קצב איטי מאוד, שבלי אנזים לא תקרה באופן ספונטני, כי אנרגית האקטיבציה היא גבוהה מידי. למשל, ה-ATP היא מולקולה יציבה, היא לא תתפרק בהידרוליזה ללא אנזים, למרות ה-ΔG השלילי.


$$Glucose + P_i \xrightleftharpoons{\Delta G^{\circ\prime}=+13.8kJ/mol} Glucose-6p + H_2O$$
$$ATP + H_2O \xrightleftharpoons{\Delta G^{\circ\prime}=-30.5kJ/mol} ADP + P_i$$
$$Glucose + ATP \xrightleftharpoons{\Delta G^{\circ\prime}=-16.7kJ/mol} Glucose-6p + ADP$$

דרך אחרת להעביר אנרגיה ממולקולה אחת לאחרת היא בחמצון-חזור על ידי העברה של אלקטרונים. המחזר תורם אלקטרונים והמחמצן מקבל אלקטרונים. הדרך בה נוח לכמת אם תהליך שמעורבים בו מעברי אלקטרונים הוא ספונטני או לא, היא על ידי **פוטנציאל חיזור**. מאחר ובחמצון-חיזור עוברים אלקטרונים, נוצר בתהליך מתח חשמלי, אותו ניתן למדוד.

פוטנציאל החיזור נמדד ב-ΔV, והוא קשור לאנרגיה החופשית בקשר הבא: ΔV = -nFΔG.

(n- מספר האלקטרונים שעברו בתהליך; F- קבוע פארדי).

לכן, כאשר ה-ΔV יהיה חיובי, התגובה תהיה ספונטנית (ההפך מ-ΔG). חמצון-חיזור נפוץ בהרבה מאוד תהליכים, גם גליקוליזה.

מולקולות שיכולות לאגור אלקטרונים: $NAD^+/NADP^+$ ו- FAD. טבעות ה-NAD^+ וה-$NADP^+$ יכולות לקבל אלקטרון 1. המחזר הוא הידרט (אטום מימן עם שני אלקטרונים), והוא הופך אותם ל-NADH, שנושא 2 אלקטרונים- זה על הטבעת וזה על ההידרט.

FAD היא מולקולה שיכולה לקבל עד 2 אלקטרונים, ולהפוך ל-$FADH_2$. הוא מוכר גם כויטמין B2, וחייבים לצרוך אותו במזון, כי הגוף לא יודע לסנתז אותו. לשים לב- היא יכולה לקבל עד 2 אלקטרונים, כלומר יכולה לקבל גם 1.

למעברי אלקטרונים יש תפקיד קריטי בהמון תגובות. למשל במיטוכונדריה, אלקטרונים מועברת בשרשרת לחמצן, והאנרגיה הזו משתמשת ליצירת ה-ATP. בתהליך הזה, NADH מחומצן על ידי O_2 ומפורק ל-NAD^+. האנרגיה מפירוק זה מספיקה ליצירה של 2.5 ATP.

פחמימות

<u>מבנה פחמימות</u>

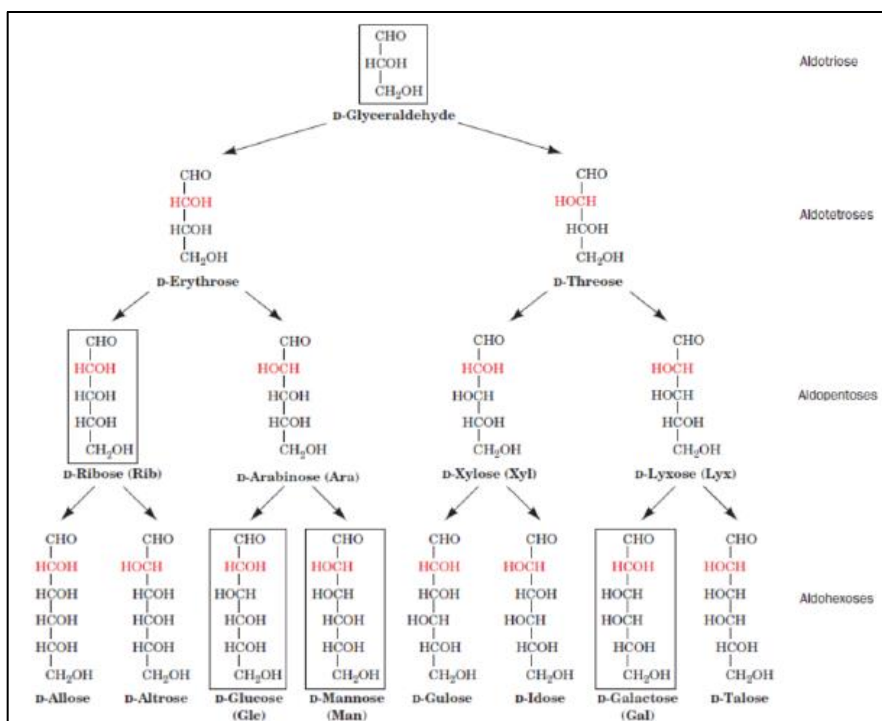
פחמימות הן הביומולקולות הכי נפוצות בטבע. יש להן מגוון שימושים- מהפקת אנרגיה ועד חומר בניין פיסי.

תאית הוא חומר בניין בצמחים המורכב משרשראות ארוכות של גלוקוז, שיוצרות סיבים ארוכים וחזקים. הוא מחזיק את כל המבנה של הצמח- הגבעול, העלה. כדי לעכל את התאית (לשבור אותה לגלוקוז) צריך להעלות גירה- תהליך בו החיה מעלה את האוכל מהקיבה ולועסת אותו שוב, עם אנזימים מיוחדים שיודעים לפרק תאית ומופרשים ע״י חיידקים במעי.

פחמימות הן מקור האנרגיה העיקרי של כל היצורים.

פחמימה מורכבת משלושה אלמנטים- פחמן, מימן וחמצן, ביחס של 1:2:1. היחידה הבסיסית היא **מונוסוכר** (דוגמאות: גלוקוז, גלקטוז, פרוקטוז), ואותה ניתן לשרשר **לפוליסוכר** (דוגמאות: סוכרוז ולקטוז שהם דו-סוכרים, וגליקוגן עמילן שהם רב סוכרים).

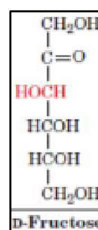
נסתכל על שתי תכונות של המונוסוכר כדי לאפיין אותו- מספר הפחמנים והקבוצה הקרבונלית.
המונוסוכר הקטן ביותר הוא עם שלושה פחמנים ונקרא טריוז. המונוסוכר הפשוט של ארבעה פחמנים יקרא טטרוז, המונוסוכר עם חמישה פחמנים יקרא פנטוז וכן הלאה.
מבחינת קבוצת הקרבוניל- אם יש קבוצת קרבוניל של קטון, הסוכר יקרא **קטוז**, אם יש קבוצת קרבוניל של אלדהיד, הסוכר יקרא **אלדוז**.



ניתן להרכיב מולקולות מאוד מרוכבות מכל הקומבינציות האלו. דוגמא על אלדוזים:

בכולם יש את היחידה הבסיסית של הפחמנים והאלדהיד, ועליהם מוסיפים עוד פחמנים.

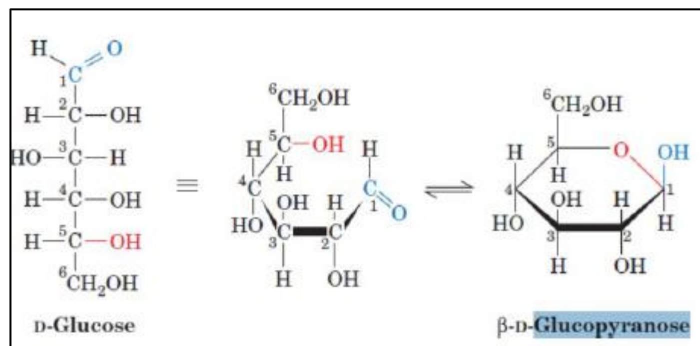
גלוקוז, גלקטוז ומנוז הם הקסוזים ממשפחת האלדוז.

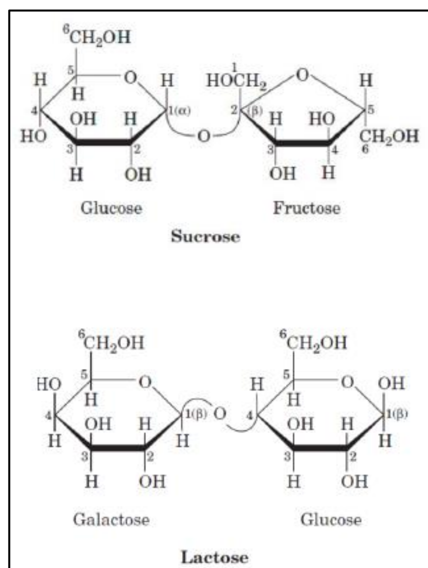


פרוקטוז הוא הסוכר המרכזי במשפחת הקטוזים. הפחמן הקרבונלי בו הוא לא בקצה השרשרת, ולכן בצורתו הציקלית הוא טבעת מחומשת.

ניתן על ידי שינוי של קבוצת הקרבוניל לעבור מקטוז לאלדוז. זה קורה בגליקוליזה.

נרחיב על גלוקוז. לגלוקוז יש 2 איזומרים- L,D (בטבע יש רק D). בתמיסה, יש שיווי משקל בין הצורה הפתוחה של גלוקוז לצורה ציקלית שלו (זה נכון לכל המונוסוכרים). השכיחות של כל אחד תהיה תלויה בתנאי התמיסה. בצורה הליניארית של גלוקוז ממספרים את הפחמנים- הפחמן הראשון הוא הפחמן הקרבונילי. התהליכים המטבולים מתרחשים על פחמנים מאוד ספציפיים בשרשרת.





כאמור, מונוסוכרים מתחברים יחד לשרשראות של פולי-סוכרים. דו-סוכרים היא הצורה הנפוצה ביותר של רב-סוכר. הדוגמא הנפוצה ביותר היא סוכרוז. הוא מורכב מגלוקוז ופרוקטוז. זו הצורה העיקרית בה משנעים סוכר בצמחים. לקטוז הוא גם דו-סוכר, והוא קיים בצורה טבעית רק בחלב. הוא שילוב של גלקטוז וגלוקוז. צורת החיבור בין שני המונוסוכרים בסוכרוז ולקטוז היא שונה, ויש לזה חשיבות בפירוק של הדו-סוכר. כאשר רוצים לקבל מדו-סוכר גלוקוז, צריך לפרק את הקשר בין שני המונו-סוכרים. בבני אדם, האנזים שמפרק את הלקטוז מצוי בכמויות מאוד נמוכות, ואצל אנשים שהוא נמוך מדי נראה חוסר רגישות ללקטוז. זה נפוץ במזרח אסיה.

סכרין (ממתיק מלאכותי) הוא מונוסוכר שלא עובר מטבוליזם. בכמויות גדולות הוא מסרטן. אפסרטיים (גם ממתיק מלאכותי), הוא מונוסוכר שמתפרק לאספרטיט, פניל-אלנין ומתנול. מנתול יכול להיות רעיל בכמויות גדולות, אבל זה מאוד לא משמעותי במשקאות דיאט. המולקולות האלו לא מאוד יציבות- אסור לחמם אותם, ולאורך זמן הן מתפרקות.

הרב סוכרים הנפוצים ביותר הם עמילן וגליקוגן. הם רב סוכרים שמשמשים לאחסון של פחמימות לשעת צורך. עמילן מצוי בצמחים, גליקוגן ביונקים. שניהם נמצאים בגרנולות לא מסיסות. המבנה של הגרנולות הוא מסועף והוא מאפשר שינוע מהיר של גלוקוז כאשר הוא נדרש.

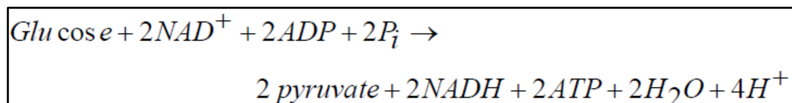
תאית (צלולוז) וכיטין הם רב סוכרים שמשמשים לבנייה. התאית בצמחים והכיטין בחסרי חוליות ושמרים.
מדובר בשרשראות מאוד ארוכות של כ-15000 מולקולות גלוקוז. לבעלי חוליות, אין אנזימים שיודעים לפרק תאית. היצורים שאוכלים צמחים עשו סימביוזה עם מיקרואורגניזמים המפרישים אנזימים המפרקים את התאית.

גליקוליזה

זו סדרה של עשר ריאקציות בהן גלוקוז מתפרק ל-2 פירובטים (מולקולות של 3 פחמנים) ונוצרות 2 מולקולות ATP. היא חלק מתהליך הפקת האנרגיה, ביחד עם מעגל קרבס וזרחון חמצוני. הגליקוליזה מתרחשת בציטופלסמה.

גלוקוז מופיע בדם כתוצאה מפירוק של רב סוכרים אחרים (לדוגמא גליקוגן שפורק בכבד, או עמילן וגליקוגן שנצרכו במזון), או כתוצאה של סינתזה ממקורות לא פחמימתיים (בתהליך שנקרא גלוקוניאוגינזה). הגלוקוז נכנס לתאים על ידי טרנספורטרים ייעודיים. תאים סרטניים צורכים המון המון גלוקוז, והיום, כדי לזהות תאים סרטניים, בודקים צריכה של גלוקוז בתאים בסריקת PET.

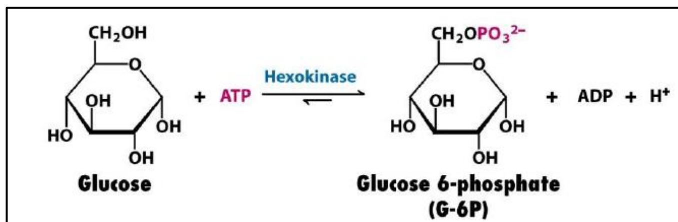
את הגליקוליזה בגדול מחלקים ל-2 חלקים : החלק הראשון כולל השקעה של אנרגיה. 2 מולקולות ATP מושקעות כדי לזרחן את הגלוקוז ולפרק אותו לשתי מולקולות גליצראלדהיד-3-פוספט (GAP). זו מולקולה בש״מ עם תצורה נוספת של DHAP. החלק השני הוא שלב של הפקת אנרגיה. אחד מהתוצרים הללו עוברת שרשרת תהליכים שבסוף נותן פירובט, ו-2 ATP. מאחר וזה קורה על 2 מולקולות GAP, נוצרות 4 מולקולות ATP, והמאזן האנרגטי של כל הגליקוליזה הוא 2 ATP. כמו כן, במהלך הגליקוליזה מחוזרים שני +NAD. המאזן הסופי הוא :



$$Glucose + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\,pyruvate + 2NADH + 2ATP + 2H_2O + 4H^+$$

בסוף כל זה נעשה כדי לקבל את הפירובט, שהוא יכנס למיטוכונדריה ובסוף יופקו ממנו המון מולקולות ATP, בתהליכי פרמנטציה או רספירציה- עליהם נרחיב בהמשך.

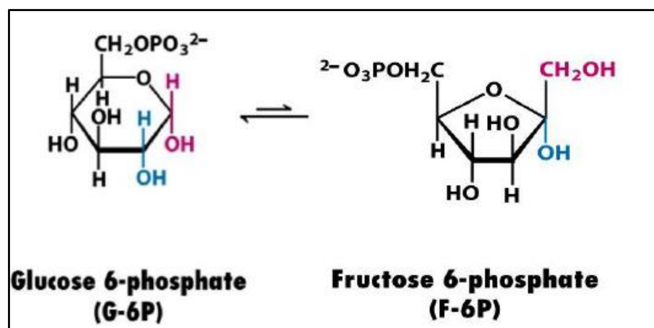
שלב ראשון:



זרחון של גלוקוז על ידי הקסוקינאז. שלב זה צורך ATP. הקסוז הוא סוכר של 6 פחמנים, ולכן הקסוקינאז הוא אנזים שמזרחן סוכר הקסוז. ההקסוקינאז מזהה את כל ההקסוזות חוץ מגלקטוז. התוצר הוא גלוקוז-6-פוספט, כי הפוספט הצטרף לפחמן 6 בטבעת של הגלוקוז. יש לזכור כי האנזים הוא מולקולת ענק, והיא גדולה בכמה סדרי גודל מהסובסטרט. הפעילות של האנזימים קשורה למבנה המרחבי שלהם, בעת הקשירה בין האנזים לסובסטרט, האנזים עובר שינוים מרחביים גדולים. אחד האמצעים המרכזים לבקר את השטפים המטבולים הוא שינוים אלוסטרים של האנזים.

מגנזיום הוא קו-פקטור של ההקסוקינאז. כאשר הוא לא נמצא, ההקסוקינז יעכב את הריאקציה.

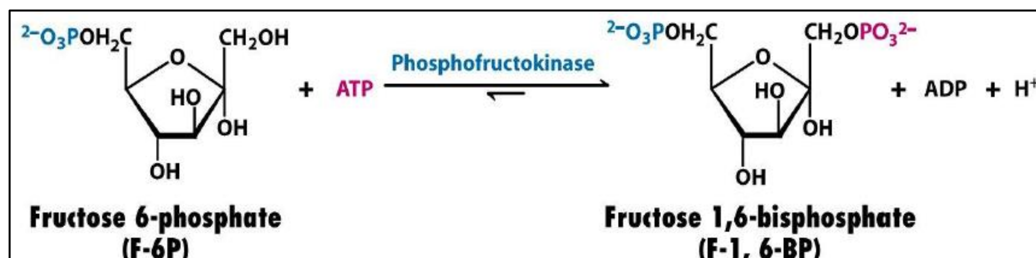
שלב שני:



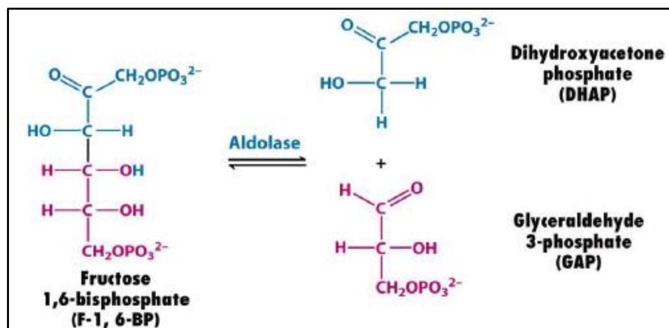
גלוקוז-6-פוספט הופך לפרוקטוז-6-פוספט. גלוקוז הוא אלדוז ופרוקטוז הוא קטוז. האנזים הוא פוספוגלוקו איזומרז, כי הוא עושה איזומרזציה לגלוקוז.

שלב שלישי:

צורכים את ה- ATP השני, והופכים את הפרוקטוז-6-פוספט לפרוקטוז 1,6 -ביפוספט. לשם כך יש קינז בשם פוספופרוקטוזקינז (PFK), והוא מזרחן את הפחמן הראשון. זה השלב המבוקר ביותר של הגליקוליזה, והוא נחשב ל- rate limiting step של הגליקוליזה. אנזים ה-PFK עובר אקטיבציה ורפרסיה אלוסטרית.



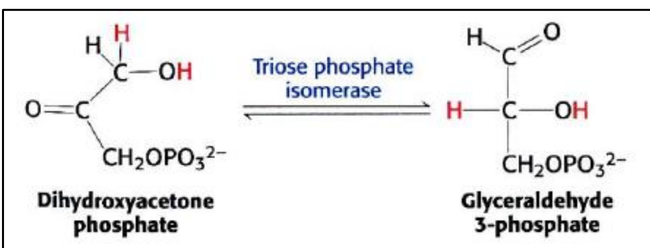
שלב רביעי:



פרוקטוז-1,6-בי-פוספט נשבר לשני תוצרים בעלי שלושה פחמנים כל אחד ע״י אנזים אלדולז. השבירה אינה סימטרית, תוצר אחד הוא איזומר של קטוז- DHAP, והשני איזומר של אלדוז- GAP. רק ה-GAP ממשיך בגליקוליזה. לפיכך ה-DHAP אינו נחוץ.

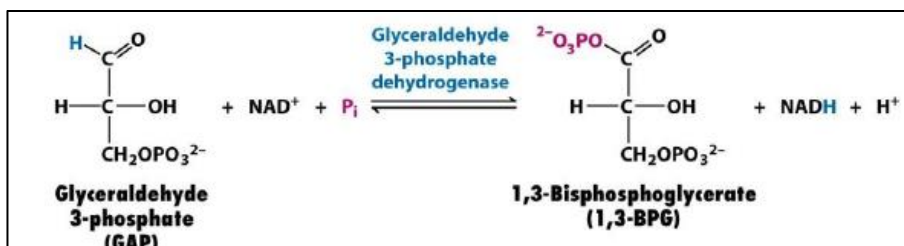
שלב חמישי:

אנזים טריאוז-פוספט-איזומרז (TIM) ממיר את ה- DHAP ל-GAP. המבנה של האנזים הוא בעל מוטיב של α/β barrel. מדובר בשרשרת של שמונה גדילי ביתא מוקפים בשמונה גדילי אלפא, מה שיוצר מבנה של חבית. כתוצאה מכך, הפעילות הקטליטית היא מאוד יעילה, והוא נחשב "האנזים המושלם". ההגדרה אנזים מושלם מציינת כי קצב הריאקציה מוגבלת על ידי דיפוזיה. כדי שריאקציה תתרחש, צריך קודם שיווצר הקומפלקס אנזים-סובסטרט. לפיכך, הקצב של הריאקציה מושפע מהאפיניות בין האנזים לסובסטרט ומהריכוז של שניהם (וגם מה-K_{cat} אבל נזניח את זה כרגע). כאשר האפיניות ES היא מאוד מאוד גבוהה, קצב יצירת התוצר תלוי בריכוזים של האנזים-סובסטרט (בעצם הסיכוי שהם יפגשו). כתוצאה מכך, השו"מ משקל בין ה-GAP וה-DHAP הוא מאוד מוטה לכיוון ה-GAP, כי ברגע שהאנזים יפגוש את הסובסטרט נקבל את התוצר.



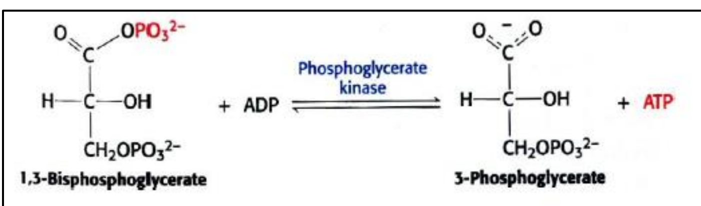
שלב שישי:

GAP עובר זרחון וחמצון ע"י אנזים גליצרל-אלדהיד-3-פוספט-דה הידרוגינז (GAPDH). האנזים עובד עם קו-פקטור NAD+. למרות שיש זרחון לא צריך ATP. בשלב הזה נוצרת מולקולה עשירה באנרגיה (כמו ATP) הנקראת 1,3 בי-פוספוגליצרט (1,3-BPG).



שלב שביעי:

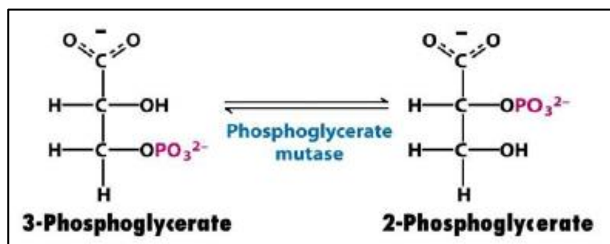
1,3-ביפוספוגליצרט מגיב עם ADP ומקבלים 3-פוספוגליצרט (3PG) ו- ATP. האנזים הוא פוספוגליצרט קינז.

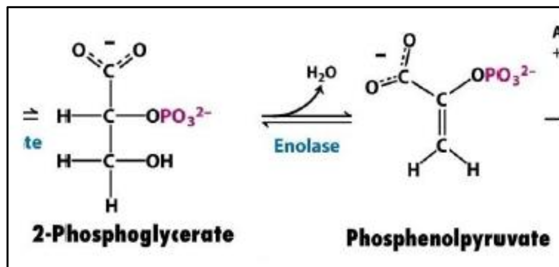


ריאקציות 6-7 הן ריאקציות מצומדות, בהם משתמשים באנרגיה שאצורה בתוצר ביניים ליצירת ATP. ריאקציה 6 היא בעלת דלתא G חיובית, וריאקציה 7 היא בעלת דלתא G שלילי, שגדול בערך מוחלט מזה של ריאקציה 6, וכך הוא מאפשר את קיומה. מאחר וזה קורה על שתי מולקולות GAP יש 2 מולקולות ATP.

שלב שמיני:

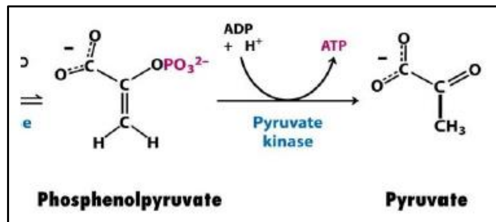
3-פוספו-גליצרט הופך ל-2-פוספוגליצרט. הקבוצה הפונקציונלית של הפוספט עוברה מפחמן 3 לפחמן 2. זה נעשה על ידי אנזים פוספו-גליצרט מוטז.





שלב תשיעי:

2-פוספוגליצרט הופך למולקולה עשירה באנרגיה בשם PEP (פוספו-אנול-פירובט). האנזים הוא אנולז, והוא מוציא מולקולת מים מה-2-פוספוגליצרט.



שלב עשירי:

אנזים פירובט קינז מעביר את הפוספט של ה-PEP למולקולת ADP, וכך נוצר פירובט, ו-ATP.

וזה קורה הרי פעמיים כי היו שני GAP.

<u>בקרה על הגליקוליזה</u>

התהליך רגיש לצרכים של התא. ברגע שיש מספיק ATP הוא יעצר.

נקודה שצריך להתעכב עליה היא מהי ערכי האנרגיה החופשית של התהליכים של הגליקוליזה, וספציפית מהם בתנאים של הגוף (37 מעלות, pH פיסיולוגי וכו').

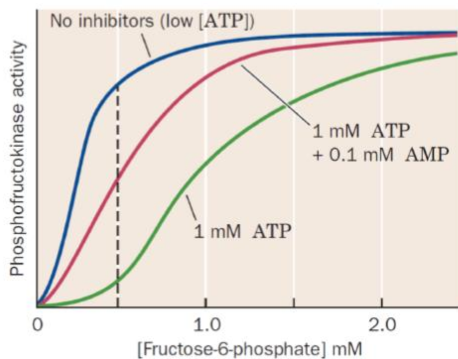
כאשר בוחנים את ערכי ה- ΔG של כל הריאקציות של גליקוליזה בתנאי הגוף מוצאים כי רק בשלבים 1, 3, ו-10 יש שינוי גדול ב-ΔG . כלומר אלו שלבים שהם מאוד ספונטנים, בעוד ששאר השלבים הם די קרובים לש״מ (ה-ΔG קרוב לאפס). אלו שלבים בהם יש פוספורילציה ומעורבות של ATP (לא בהכרח ניצול אלא גם יצירה). אלו המקומות בהם הכי נוח לבקר את התהליך. קינזות הם אנזימים שבהן המעבר בין מצב אקטיבי ולא אקטיבי תלוי בקשירה של ATP, וזה מערב שינוים מרחבים גדולים באנזים עצמו. בריאקציות שקרובות לש״מ אין המון מקום להתערבות ובקרה, כי אין יותר מדי מה לשחק עם היעילות של האנזים.

מוצאים כי עיקר הבקרה היא באמצע- שלב 3. הכי הגיוני היה למקד את הבקרה בשלב 1, אבל זה לא קורה כי לעיתים מולקולות נכנסות לגליקוליזה החל משלב 2. זה קורה כאשר הפירוק הוא מגליקוגן ולא מגלוקוז. אנזים ה-PFK הוא נקודת בקרה מרכזית של הגליקוליזה.

הרגולציה על PFK:

אנזים זה הוא טטרמר. הוא גדול פי כמה סדרי גודל מהסובסטרט שלו. יש לו שני מצבים מרחביים: R ו-T, כאשר מצב R הוא המצב שקושר באפיניות גבוהה את הסובסטרט. נזכיר ארבעה רגולטורים של האנזים.

הראשון הוא ATP, והוא מעכב. ל-PFK יש שני אתרי קשירה ל-ATP- אחד אתר קשירה כסובסטרט (ה-ATP הוא גם סובסטרט של האנזים והוא הכרחי לריאקציה), והשני הוא אתר קישור רגולטורי. וכמובן שיש גם אתר קשירה לסובסטרט F6P. ברגע ש-ATP נקשר לאתר הרגולטורי, הוא תוקע את האנזים במצב מרחבי T, וזה מונע ממנו לקשור את הסובסטרט F6P. התוצאה היא שכאשר יש הרבה ATP בסביבה, יש יותר סבירות כי ה-ATP יקשר לאתר הרגולטורי, ויעכב את האנזים.



כאשר ה-ATP הוא נמוך, מוצאים שהתגובה תלויה בסובסטרט- זה דומה לעקומת מיכאליס מנטן, והקצב הוא מהיר יותר. כאשר מוסיפים את ATP, קצב התגובה יורד. במצב זה התגובה של פירוק הסובסטרט לתוצר לא נעלמת, עדיין יש רגישות מסוימת ל-F6P, היא רק נמוכה יותר. זאת אומרת שהרגולציה על ידי ATP היא מאוד קטנה. ה-ATP מוביל לשינויים של כ-10% ביעילות של האנזים (לטובה או לרעה)- עקומת הסיגמואיד תזוז 10% למעלה או למטה עם ובלי ATP.

אבל אלו הממצאים כאשר עושים את הבדיקות במבחנה. בתאים, יש בסביבה גם AMP. AMP הוא רגולטור נוסף, וכאשר הוא נוכח, הוא מזרז את התגובה (הוא נקשר ליחידה הרגולטורית ותוקע את האנזים במצב R). ריכוז ה-AMP קשור לריכוז ה-ATP. שניהם יכולים להגיב יחד ולהפוך ל-ADP. (ATP + AMP ↔ 2ADP). השי"מ של התגובה הזו הוא מאוד קבוע בתא, והוא מושג מאוד מהר אם יש תזוזה משי"מ. כתוצאה מכך, ירידה של 10% בלבד ב-ATP יכולה להוביל לעלייה של כ-100% ב-ADP, וכ-400% ב-AMP (ניתן לראות זאת מחישובים ושימוש ב-K קבוע ש"מ). הדבר החשוב להבין הוא שניתן להשיג רגולציה רחבה על הפעילות של האנזים ע"י ה-ATP וה-AMP, רגולציה שהיא הרבה יותר רחבה מאשר אם הוא היה מבוקר רק על ידי ATP, שכן ירידה קטנה בכמות ה-ATP תגרור עלייה גדולה ב-AMP, ויהיה כוח מניע חזק לגליקוליזה.

מגנזיום הוא רגולטור נוסף. כאשר הוא נקשר ל-ATP הוא מעודד אותו להיקשר לאתר שלו כסובסטרט ולא לאתר הרגולטורי.

הרגולטור האחרון הוא ריכוז הגלוקוז.

מוטיב מרכזי של רגולציה של שטפים מטבולים הוא **מיחזור סובסטרט**. הריאקציה של ה-PFK היא הפיכה- כלומר יש ריאקציה הפוכה בה פרוקטוז 1,3-בי-פוספט הופך לפרוקטוז-6-פוספט. זה מתווך על ידי אנזים אחר שהוא פוספטז. בשריר במנוחה, הקצב של שתי הריאקציות האלו מאוד דומה (לא קטן אבל דומה), וזה אנלוגי למצב בו לוחצים על הגז והברקס בו זמנית. זה מאפשר בקרה מאוד מהירה, כי כל מה שצריך לעשות בעת הצורך הוא להוריד את הרגל מהברקס. אם רוצים לשנע גליקוליזה, רק צריך לעכב את הפוספטז, ולא להתחיל לסנתז את הקינז. אותו אנזים פוספטז הוא אנזים שמשתתף בריאקציה של יצירת גלוקוז- גלוקוניאוגינזה. זה תהליך שמתרחש בכבד, ולפיכך, אותו אנזים מאוד רגיש לכמויות של הגלוקוז.

חיות רבות מייצרות חום על ידי מיחזור סובסטרט- תהליך של nonshivering thermogenesis. כאשר תהליך קורה בו זמנית לשני הכיוונים, נפלט חום. פגיעה ביכולת הזו גוררת רגישות לקור. תהליך זה מתווך באמצעות הורמון תירואיד. לחיות ואנשים הסובלים מהשמנת יתר יש יכולת פחותה להעלות את רמת הורמון התירואיד השולט במטבוליזם, והם סובלים מרגישות לקור.

<u>כניסה לגליקוליזה מהקסוזים אחרים</u>

יש שלושה הקסוזים אחרים משמעותיים מלבד גלוקוז: גלקטוז, מנוז ופרוקטוז.

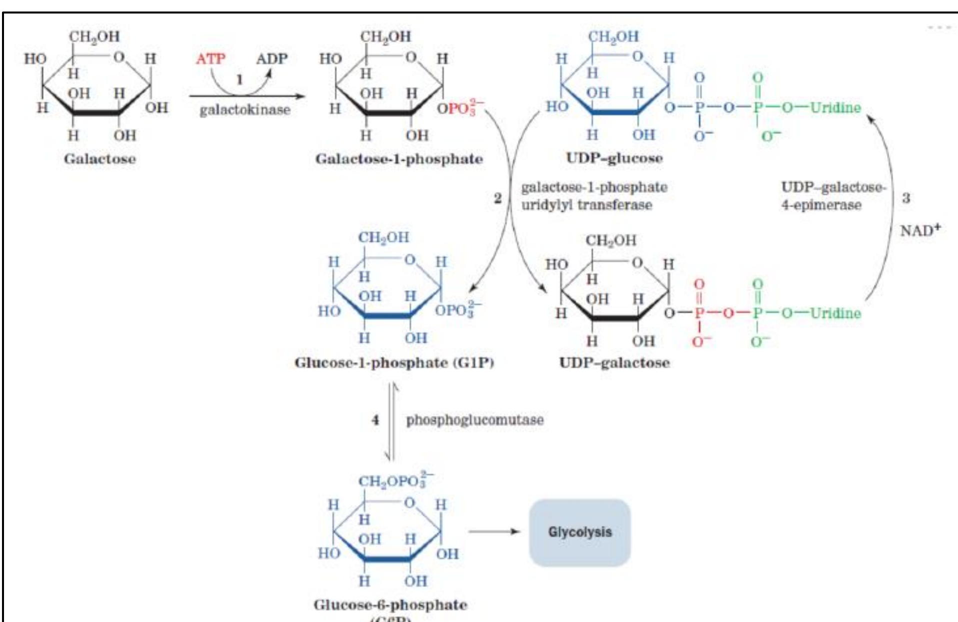
השלב הראשון של הגליקוליזה הוא זרחון של גלוקוז על ידי הקסוקינאז. אותו הקסוקינאז יודע לזהות הקסוזים נוספים מלבד גלוקוז.

כניסה מפרוקטוז ומנוז:

התהליך של עיבוד פרוקטוז יהיה שונה בכבד ובשריר. בשריר, הפרוקטוז עובר פוספורילציה לפרוקטוז-6-פוספט, ע"י אנזים הקסוקינז. מקביל לסיום שלב שני של הגליקוליזה מגלוקוז. אותו דבר קורה עם מנוז- הוא הופך לפרוקטוז, ואז מזורחן.

בכבד, מעורבים 7 אנזימים בהפיכה של פרוקטוז לתוצר אחר של הגליקוליזה- GAP, שהוא השלב הרביעי של הגליקוליזה. משום כך, הוא עוקף את הבקרה העיקרית על הגליקוליזה (את שלב ה-PFK). כתוצאה מכך, מאזן ה-ATP משתבש ונוצרים יותר שומנים. יש השערה כי העלייה בצריכת פרוקטוז היא שגורמת להשמנת יתר.

כניסה מגלקטוז :



מקור גלקטוז עיקרי הוא לקטוז (לקטוז הוא דו סוכר של גלוקוז וגלקטוז). גלקטוז לא מזוהה על ידי ההקסוקינאז. בצריכת לקטוז, הגלוקוז יפורק רגיל, והגלקטוז צריך לעבור אפימריזציה. לשם כך הגלקטוז יכנס לשני מסלולים. באחד מהם הוא יומר ל-UDP גלקטוז (יורידין-די-פוספט גלקטוז)- בתהליך שלא נלמד אותו. השני הוא תהליך רב שלבי, בסיומו נקבל גלוקוז-6-פוספט. שלב ראשון הוא זרחון הגלקטוז ע״י גלקטו-קינז. זה מקביל לפעולת ההקסוקינאז. הגלקטוז המזורחן יכול להגיב עם UDP-גלוקוז ליצירה של גלוקוז-1-פוספט ו-UDP גלקטוז.

המקור ל-UDP גלוקוז (המגיב) הוא UDP גלקטוז (התוצר). כלומר יש פה תהליך של מחזור, בו ה-UDP גלקטוז (התוצר) הופך ל-UDP גלוקוז (המגיב) וחוזר ל-UDP גלקטוז.

את הגלוקוז-1-פוספט (התוצר הנוסף) אפשר להפוך לגלוקוז 6-פוספט על ידי הזזה של הפוספט (עם אנזים פוספו-גלוקומוטז), וזה כבר אחד מתוצרי הביניים של הגליקוליזה.

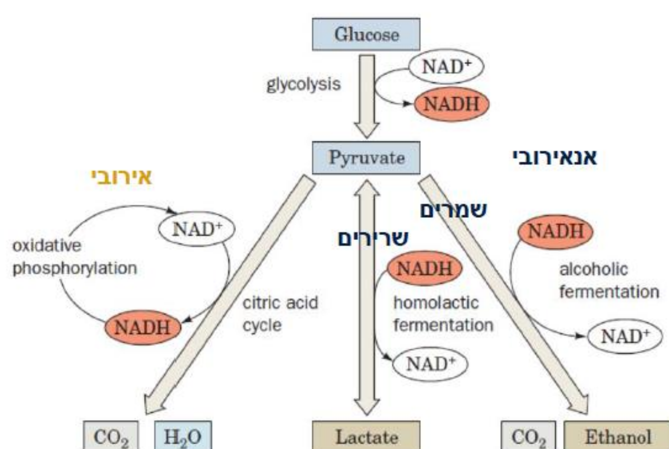
יש הפרעה גנטית בשם גלקטוזמיה, בה אי אפשר לעשות מטבוליזם לגלקטוז. במחלה זו יש חסר בגלקטוז-1-פוספט-אורידיליל-טרנספרז, אחד האנזימים שמשתתף בהפיכת גלקטוז לגלוקוז-6-פוספט.

זה מוביל להצטברות של מטבוליטים טוקסים (ה-UDP השונים הם רעילים), שיכולים להצטבר בעין ולהפוך לקטרקט, או להצטבר במוח וליצור פיגור, ובמקרים נדירים להוביל למוות מנזק בכבד. דיאטה ללא גלקטוז עוזרת לתסמינים של הגלקטוזומיה, למעט הפיגור.

<u>גורל הפירובטים</u>

הפירובטים יכולים להתפרק בצורות שונות- כתלות ברקמה. הם יכולים לעשות פירוק אירובי בנוכחות חמצן- זו נשימה/**רספירציה**, דרך ה-citric acid cycle, ולהפוך לפד״ח ומים ;

אופציה אחרת היא נשימה אנ-אירובית- **פרמנטציה**. יש אפשרות לפרמנטציה אלכוהולית (בשמרים)- שם התוצרים הם אתנול ופד״ח (משמש לתסיסה- יצירת בצק, אלכוהול), ופרמנטציה הומולקטית (זה בשרירים), שם התוצר הוא לקטט.



אפקט ורבורג - תאים סרטניים יכולים לעשות פרמנטציה גם בסביבה עם חמצן. הם אפילו עושים את זה יותר מאשר רספירציה. כנ"ל שמרים.

פרמנטציה בשרירים:

תהליך שקורה כאשר אין מספיק חמצן, או כאשר הדרישה ל-ATP היא גבוהה מאוד ואין זמן להיכנס לרספירציה (קצב יצירת ATP בגליקוליזה הוא מהיר יותר מברספירציה אבל כמובן שכמות ה-ATP הנוצרת היא הרבה יותר נמוכה). בשרירים בפעולה גם יש דרישה מהירה ל-ATP, וגם מהר מאוד הסביבה הופכת לאנאירובית. כדי שתהיה אפשרות להמשיך ולעשות גליקוליזה בשרירים, צריך לפנות את הפירובט שנוצר.

ה-NADH שנוצר בגליקוליזה משמש להפיכה של הפירובט ללקטט (האנזים הוא לקטט דה-הידרוגנז). תגובה זו היא בש"מ. זה מבוי סתום מבחינה מטבולית- הלקטט יכול לחזור לפירובט או לצאת מהתא אל עבר הכבד, שם ניתן לייצר ממנו גלוקוז מחדש, לצורך עוד גליקוליזות.

לשים לב- בפרמנטציה הומולקטית אין ייצור של ATP מעבר לזה הנוצר בגליקוליזה. הוא נעשה משום שאין חמצן אז אין אפשרות לפרק את הפירובט ברספירציה, וצריך לפנות את הפירובט, כדי לא להוציא תגובות אחרות מש"מ.

בתהליך הפרמנטציה, לא רק שמפסידים את ה-ATP שהיו יכולים להיווצר בתהליך הרספירציה, אלא שגם מאבדים מולקולת NADH, שזו מולקולה עתירת אנרגיה שממנה ניתן להפיק 2.5 מולקולות ATP.

התחושה של שרירים תפוסים נובעת מחומצה לקטית (הלקטט הופך לחומצה לקטית).

פרמנטציה אלכוהולית:

פירובט הופך לפחמן דו חמצני ואתנול. זה משמש להתססה של בצק, יין, בירה.

האבחנה שיש הבדל בין גליקוליזה לרספירציה התגלתה בשמרים וכונתה אפקט פסטר. חוקרים שמו לב שאם שמים על צלחת פטרי שמרים, ודואגים שהסביבה תהיה אנאירובית, רואים כי הם צורכים יותר גלוקוז מהמדיום. כאשר לוקחים את החמצן, המקור העיקרי לאנרגיה הוא גליקוליזה, והיא מפיקה הרבה פחות אנרגיה מתהליך הנשימה, ולכן יש עלייה בקצב צריכת הגלוקוז. קצב הגליקוליזה האנאירובית יכול להיות מהיר פי 100 מזרחון חמצני.

הערה: גלוקוז יכול ללכת לשתי ריאקציות מרכזיות: הגליקוליזה ומסלול הפנטוז-פוספט, שם הוא נוצרים אבני בניין לתאים, שומנים ונוקלאוטידים. נלמד על זה בהמשך.

<u>citric-acid cycle</u>

מסלול זה התפתח לפני כמה מיליארדי שנים, שרמות החמצן באטמוספירה הפכו להיות משמעותיות.

כל תוצרי פירוק המזון- פירובטים שהגיעו מפחמימות, חומצות אמינו מהחלבונים וחומצות שומן של הליפידים הופכים לתוצר אחד משותף **אציטל קו-A**. מולקולה זו יכולה להיכנס ל-citric-acid cycle, שנקרא גם **מעגל קרבס** או TCA cycle.

מעגל זה הוא סדרה של שמונה ריאקציות בהם האצטיל קו-A הופך לשתי מולקולות פד"ח וקו-A, תוך יצירת NADH, $FADH_2$, GTP. תהליך זה (באאוקריוטים) מתרחש במיטוכונדריה, וכל האנזימים צריכים למצוא את דרכם אליה.

שלבי מעגל קרבס:

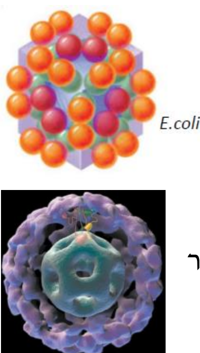
הריאקציה נטו היא:



$$3NAD^+ + FAD + GDP + Pi + acetyl\text{-}coA \rightarrow 3NADH + FADH_2 + GTP + coA + 2CO_2$$

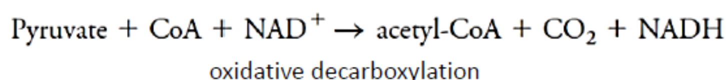
התהליך הוא כשמו-מעגלי. התוצר האחרון (oxaloacetate) הוא גם המגיב הראשון (יחד עם אציטל קו A), ולכן הוא לא מופיע בתגובה נטו. פחמני הפד״ח אינם הפחמנים שהרכיבו את האציטל קו-A. כל תוצרי הריאקציה (תוצרי ביניים של התגובה) משמשים כמקורות לביוסינתזה של רכיבים אחרים. כלומר זה לא רק למען הפקת אנרגיה אלא גם חומרי בניין. צריך להכיר כמה מהמטבוליטים האלו: את הציטרט (חומצת לימון), שמשמש לבנייה של חומצות שומן וכולסטרול, את המאלט שמשמש לבניית של גלוקוז, את האלפא-קטוגלוטרט והאוקסלואצטט, שמשמשים לבניית של חומצות אמינו, והסוקצינל קו-A שמשמש לבניית פרופירינים. כל אותם חומרי ביניים יכולים להגיע למעגל מתהליכים חיצוניים ולא רק להיווצר במעגל קרבס.

שלב מקדים: פירובט הופך לאצטיל קו-A. גם תהליך זה מתרחש במיטוכונדריה. האצטיל קו-A נדרש לתהליכים נוספים במיטוכונדריה מלבד רספירציה.



האנזים שהופך פירובט לאציטל קו-A נקרא פירובט דה-הידרוגנז. זה מולטי אנזים (קו-אנזים) שעושה ריאקציה בעלת חמישה שלבים- שהיא דה-קרבוקסילציה חימצונית לפירובט. קו אנזים הוא אנזים שמורכב מהמון יחידות, שכל יחידה היא חלבון אחר. התת יחידות שונות זו מזו (כלומר זה שונה מדימר, טטרמר וכן הלאה שראינו באנזימים אחרים). פירובט דה הידרוגנז מורכב משלושה אנזימים שונים: E1, E2, E3, שיוצרים גיאומטריה מיוחדת. ב-E.coli הסידור הוא במבנה סימטרי של קוביה (מ-24 יחידות E2 המוקפת במעטפת (של 24 E1 ו-12 E3), וביונקים זה סידור יותר מורכב של קוביה יותר מסובכת (יותר פאות, ויותר חלבונים המרכיבים את הליבה והמעטפת, אבל עדיין E2 בליבה והאחרים במעטפת). כל אחת מתתי הריאקציות מערבת אנזים אחר של ההידרוגנז.

היתרון של אנזים בו כל הריאקציות נעשות על ידי קומפלקס אחד הוא בבקרה. כך המולי לא צריכות לעשות דיפוזיה להגיע לאנזימים- הן ישר עוברות מאנזים אחד לאחר, כמו כן, כל המולי והאנזימים נמצאים באותו מקום ולא חשופים למולקולות אחרות, וניתן לבקר את פעילות כולם ביחד.



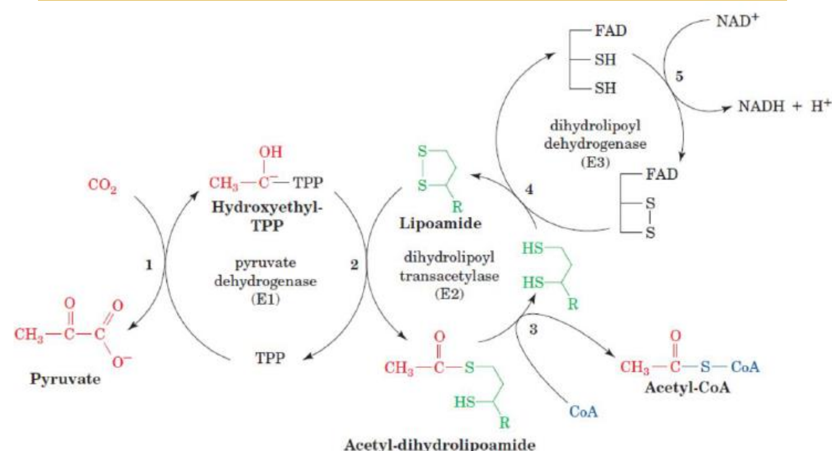
$$Pyruvate + CoA + NAD^+ \rightarrow acetyl\text{-}CoA + CO_2 + NADH$$

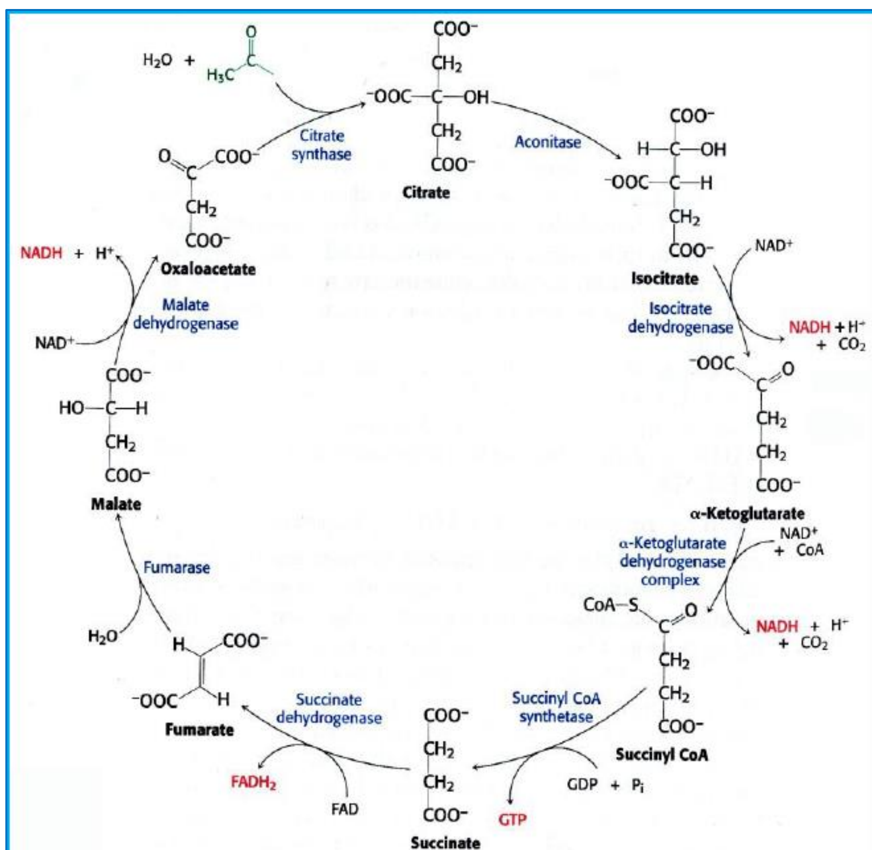
oxidative decarboxylation

בקצרה על השלבים:

לפירובט יש קבוצת אצטיל, שעוזבת אותה ועוברת לקואנזים. משתחרר פד״ח. תחילה אנזים E1 (שעובד עם קו פקטור TPP) לוקח את קבוצת האציטל מהפירובט, ואז אנזים E2 (שעובד עם קו אנזים ליפואמיד) לוקח אותה, ובסוף זה עובר לקואנזים A (זה הקופקטור השלישי בתהליך).

יש בתהליך עוד שני קו-פקטורים: FAD, NAD+, שפועלים עם E3 כדי לייצר NADH.





שלב ראשון: אציטל קו-A הופך לציטרט. זה מזורז על ידי ציטרט סינטתז.

אציטל קו-A מגיב עם אוקסלו-אצטט (הריאגנט האחרון של המעגל) ונוצר תוצר ביניים ציטרל קו-A, שהופך לציטרט.

שלב שני: ציטרט עובר איזומרציה לאיזו-ציטרט. האנזים הוא aconitase.

שלב שלישי: איזוציטרט הופך לאלפא-קטוגלוטרט ע״י איזוציטרט דה-הידרוגנז, שעושה לו דה-קרבוקסילציה (מוציא ממנו פד״ח). בשלב זה נוצרים NADH ו-CO_2.

שלב רביעי: שוב מתקבלים NADH ו-CO_2. האנזים פה הוא גם מולטי-אנזים בשם אלפא-קטוגלוטרט דה הידרוגנז, שמורכב מ-3 אנזימים: E1, E2, E3 (שהם שונים במקצת מאלו בפירובט דה-הידרוגנז). בריאקציה זו האלפא-קטוגלוטרט הופך לצוסיניל-קו-A. גם פה יש 3 ״העברות מקלי״ של קבוצה פונקציונלית.

שלב חמישי: הצוסיניל קו-A מאבד את הקבוצה הפונקציונלית (הקו-A) והופך לצוסינאט. בשלבי הביניים של הריאקציה, הקבוצה הפונקציונלית קו-A מוחלפת בקבוצת פוספריל, ואז האנזים לוקח את הפוספריל ושם אותו על ADP/GDP. כך מתקבל GTP/ATP (יונקים GTP, בקטריות וצמחים ATP). האנזים הוא צוסינל-קו-A צינסטתז.

שלב שישי: מהצוסינאט נוצר חומר בינים חשוב Fumarate- (מטבוליט שמשמש לבנייה). האנזים הוא צוסינט דה-הידרוגנז, והוא קשור לממברנה של המיטוכונדריה (זה האנזים היחיד שמחובר לממברנה). בתהליך נוצר $FADH_2$.

שלב שביעי: מהפורמיאט נוצר malate ע״י אנזים פומרז (התווספה עליו מולקולת מים).

שלב שמיני: המאלט הופך לאוקסלואצטט ע״י אנזים מאלט דה-הידרוגנז, ונוצר עוד NADH.

בכל המעגל נוצרים $FADH_2$, 3* NADH, GTP, 2* CO_2.

בקרה על מעגל קרבס:

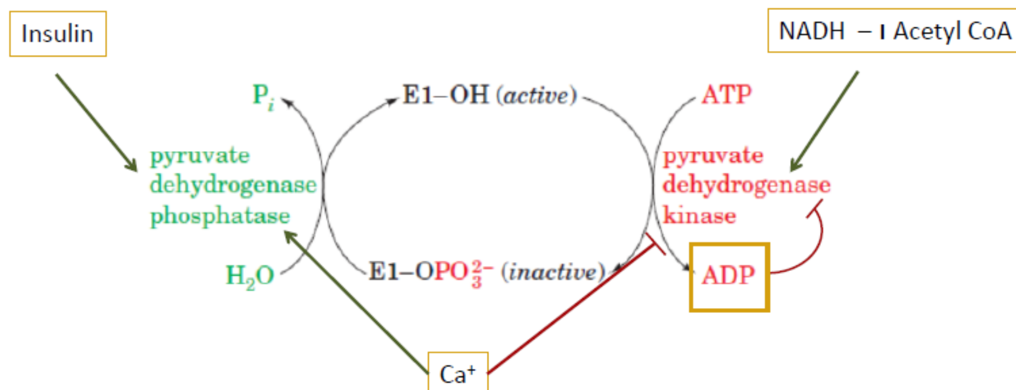
אופי הבקרה פה הוא מעט שונה מתהליך הגליקוליזה, כי פה מדובר בתהליך מעגלי. אין ריאקציה במעגל שהיא חשובה מאחרות, כי אם נסלק את אחד מתוצרי הביניים המעגל יעצר. גורמים שישפיעו על המעגל הם ריכוז ה-ATP/GTP, כמות האציטל קו-A, סטורצית החמצן, כמות תוצרי הביניים.

רגולציה על פירובט דה-הידרוגנז: יש פה אלמנט בקרה ציקלי- האלמנט הראשון E1 עובר ממצב אקטיבי ללא אקטיבי ולהיפך (ע״י קינז ופוספטז), וניתן לבקר את קצב פעילות הפירובט-דה-הדירוגנז ע״י רגולציה על האנזימים שמעבירים את E1 בין

המצבים.

הקינז מעביר את E1 למצב לא אקטיבי. הוא משפועל על ידי NADH ואציטל קו-A, ומעוכב ע״י ADP. זה די הגיוני- שיש חסר באנרגיה נרצה שהקומפלקס יפעל (ולכן נעקב את הקינז) וכשיש הרבה אנרגיה או מספיק תוצר (אציטל קו-A) נרצה לעכב את המעגל (ונפעיל את הקינז).

הפוספטז הופך את ה-E1 לאקטיבי. הפעילות שלו מבוקרת על ידי אינסולין- הוא מאקטב את הפוספטז. בגדול אינסולין הוא סיגנל שיש עודף של גלוקוז (הוא גורם גם לסינתזה של גליקוגן), וזה מצב בו נרצה שהמעגל קרבס יהיה פעיל.
קלציום הוא אלמנט נוסף שמבקר- הוא מאקטב את הפוספטז ומעכב את הקינז (לכן מקדם פעילות של פירובט דה-הידרוגנז).



בדומה לגליקוליזה, כדי לדעת מה השלבים שבהם הבקרה על האנזימים היא הכי חזקה צריך לבחון את ה-ΔG של שלבי מעגל קרבס. בתנאים סטנדרטים ניתן לדעת אותם, אבל בתנאי הגוף אנחנו רק יודעים אם הם שליליים או קרובים לש״מ. ה-ΔG הוא שלילי בשלבים 1,3,4, שבשניים מהם נוצרים NADH ופד״ח.

במקומות בהם ה-ΔG הוא שלילי, הרגולציות העיקריות על המעגל הן ע״י עיכוב תוצר, ריכוזי מגיבים (גם של המגיבים שנכנסים למעגל וגם על ידי מגיבים של תגובות הביניים), ועיכוב ע״י תוצרי ביניים מהמשך המעגל. השחקן המרכזי ברגולציה של מעגל קרבס הוא NADH. הוא עושה רגולציה לא רק כמגיב או תוצר (כלומר דרך עקרון לה שטליה), אלא גם כרגולטור אלוסטרי על האנזימים (פוספורילציה, שינוי מרחבי של האנזים וכו׳).
רגולטור חשוב אחר הוא ATP (הוא בש״מ עם GTP) ושניהם מעכבים את האלפא-קטוגלוטרט דה-הידרוגנז.

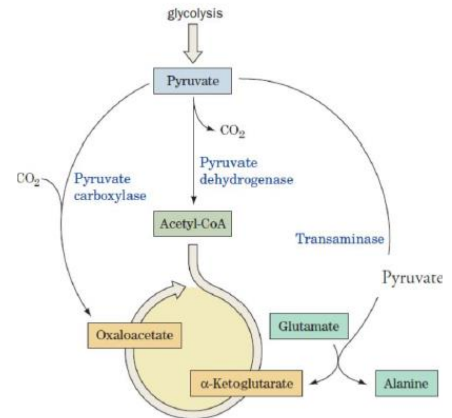
במקומות בהם הריאקציה היא קרובה לש״מ, הרגולציה היא על ידי יחס מגיבים/תוצרים (לפי לה-שטליה פשוט).
דוגמא: בתגובה בה מאלט הופך לאוקסלואצטט, נוצר גם NADH. זה שלב עם ΔG די קרוב לאפס. כאשר תהיה ירידה קלה ב-NADH, התגובה תרצה לחזור לש״מ ולכן יותר מגיבים יהפכו לתוצרים. כך ה-NADH מבקר גם ריאקציות שקרובות לשיווי משקל. וזה אחד ההבדלים המרכזיים מגליקוליזה- כי גם ריאקציות שקרובות לש״מ נמצאות בבקרה.

ריאקציות הקשורות למעגל קרבס:

מעגל זה הוא גם קטבולי וגם אנבולי- זה הופך אותו ל**אמפיבולי**. הזכרנו כמה מטבוליטים שנוצרים בתהליך וחשובים לסינתזה של חומצות אמינו, גלוקוז וחומצות שומן. ציטרט למשל עובר לציטופלסמה ויכול להפוך בה לאציטל קו-A ציטופלסמטי, שהוא יהפוך לחומצות שומן (לשים לב-אציטל קו-A במיטוכונדריה יעבור במעגל קרבס. בציטופלסמה יסנתזו ממנו חומצות שומן). לכן האציטל קו-A הוא גם אינפוט וגם אאוטפוט של המעגל.

דוגמא נוספת- אלפא-קטוגלוטרט יכול להפוך לגלוטמט ע״י גלוטמט דה-הידרוגנז, תוך ניצול NADH.

מאחר ותוצרי הביניים "נלקחים" מהמעגל כדי לשמש בתהליכים ביוסינטטים, צריך גם למלא אותם מחדש, כדי לא לעצור את המעגל. למשל, אוקסלואצטט יכול להיווצר מפירובט ע"י פירובט קרבוקסילז; פירובט יכול להגיב גם עם גלוטמט וליצור אלפא-קטוגלוטרט ואלנין.



סיכום ביניים אנרגטי: בגליקוליזה נוצרו שני ATP ועוד שני NADH.

בעת הפיכת פירובט לאציטל קו-A נוצר עוד NADH (ומאחר ויש 2 פירובטים על כל גלוקוז, אז יש שני NADH).

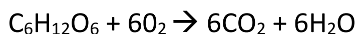
במעגל קרבס נוצרו עוד GTP, שלושה NADH ו-$FADH_2$ מכל אציטל קו-A (ופר גלוקוז אחד הכל מוכפל פי 2 כי יש שני אציטל קו-A מכל גלוקוז).

כל מולקולה של NADH תהפוך בסוף ל-2.5 מולקולות ATP וכל מולקולה של $FADH_2$ תהפוך ל-1.5 מולקולות ATP, וזה יקרה בשרשרת מעבר האלקטרונים וזרחון חימצוני.

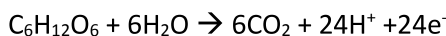
לכן בסה"כ מגלוקוז אחד צריכים להיווצר 4 ATP, 10 NADH (=25 ATP), 2$FADH_2$ (=3 ATP), שזה סה"כ 32 מולקולות ATP.

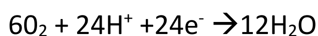
<u>נשימה תאית-רספירציה- שרשרת מעבר אלקטורנים וזרחון חמצני</u>

כאשר מסתכלים על התגובה שמתרחשת נטו בתהליך נשימה -גלוקוז מגיב עם חמצן ומתקבלים פד"ח ומים. זה התהליך שעובר הגלוקוז מתחילת הגליקוליזה ועד סוף הנשימה התאית.

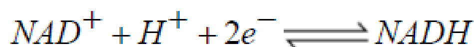


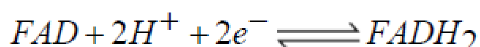
זו ריאקציה של חמצון-חיזור. בתגובות חמצון-חיזור, אפשר להסתכל בנפרד על התגובה עבור תהליך החמצון והחיזור:





תהליך הנשימה התאית הוא באופן ספציפי מה שמתואר בתהליך השני- בו חמצן עובר חיזור והופך למים, וכל השלבים שנעשו עד כה הם שלבי בהם נוצרו נשאי אלקטרונים, שיוכלו לתת את האלקטרונים לחמצן. ה-24 אלקטרונים שמועברים לחמצן נמצאים על NADH ו-$FADH_2$ (על כל אחת ממולקולות אלו יש 2 אלקטרונים). כפי שצוין קודם, יש עשרה NADH ושני $FADH_2$, וזה נותן 24 אלקטרונים.





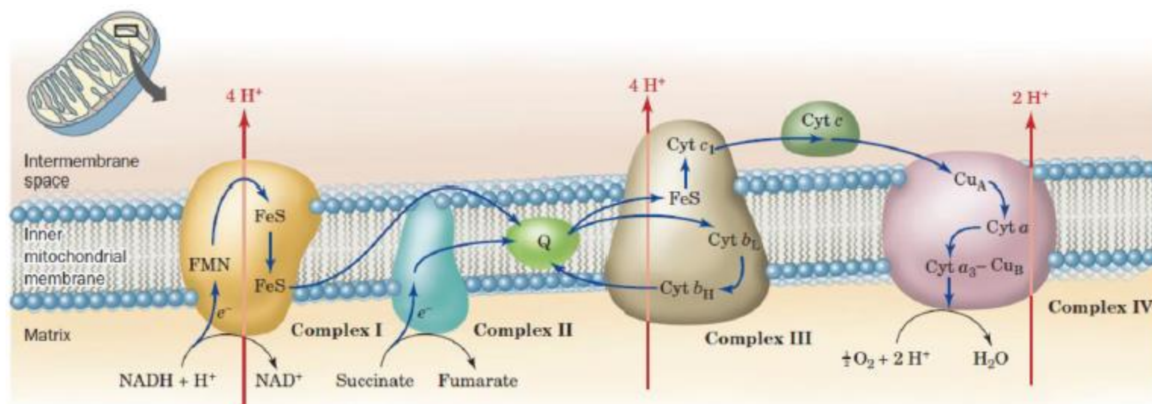
במעבר האלקטרונים מהנשאים לחמצן, נרצה שהאנרגיה האלקטרוכימית שנוצרת בתהליך תתורגם לסינתזה של ATP. לשם כך צריך מכניזם שיעביר את האלקטרונים מנשאים לחמצן, ושידע לאחסן את האנרגיה ולהפוך אותה למשהו זמין.
למיטוכונדריה יש 2 ממברנות. על הממברנה הפנימית יושבים אנזימים וקומפלקסים שמעבירים את האלקטרונים בשרשרת מאחד לשני בתגובות של חמצון-חיזור עד לחמצן. בזמן שהאלקטרונים עוברים, פרוטונים נשאבים לתווך הבין ממברנלי, ונוצר גרדיאנט פרוטונים בין התווך הבין ממברנלי למטריקס (החלק במטריקס הוא שלילי ביחס לתווך הבין ממברנלי).
התנועה חזרה של הפרוטונים אל המטריקס ע״י המפל האלקטרוכימי מייצרת ATP ע״י משאבת ATPase (המשאבה מנצלת את הכוח שנוצר על ידי התנועה של הפרוטונים ליצירה של ה-ATP).

קצת על המיטוכונדריה: היא אברון בצורך אלפיטית, באורך של כמיקרון 1. ההיפותזה המרכזית היא שזה היה תא פרוקריוטי שנכנס לתאים אאוקטריוטים וחי איתם בסימביוזה. תא טיפוסי מכיל בין 1000-2000 מיטוכונדריות. לממברנה הפנימית יש מבנה מפותל, המגדיל את שטח הפנים שלה.

בממברנה החיצונית יש פורות דרכם יכולים לעבור חלבונים עד 10 קילודלתון. הממברנה הפנימית היא יותר סלקטיבית, משום שהיצירה של מפל הפרוטונים מבוסס על האי חדירות של הממברנה. לכן יש עליה הרבה מאוד טרנספורטרים ששולטים באופן הדוק על המעבר של מטבוליטים מהמטריקס לתווך הבין ממברנלי. פד״ח, חמצן ומים יכולים לחצות אותה.
חומרים שצריכים להגיע למטריקס מתוך התווך החיצוני: ADP, פוספט, ו-NADH. על הממברנה הפנימית יהיה טרנסלוקטור שיוציא את ה-ATP שנוצר ויכניס במקומו ADP. הפוספט נעזר במפל בריכוזים של הפרוטונים כדי להיכנס.
ה-NADH לא יכנס פנימה, אלא הוא יעביר את האלקטרונים שלו בשרשרת מעבר האלקטרונים.

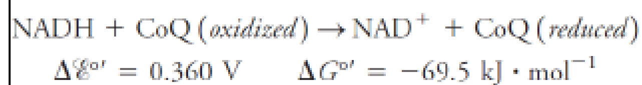
שרשרת מעבר האלקטרונים:

נראה ארבעה קומפלקסים שנמצאים על הממברנה הפנימית וקשורים בשרשרת מעבר האלקטרונים. ה-NADH מעביר את האלקטרונים שלו לקומפלקס 1 בריאקציות של חמצון-חיזור. בתוך הקומפלקס יש חלבונים עם ליבה של ברזל וגופרית, שעושים את החיזור. בתהליך זה נפלטים ארבעה פרוטונים לתווך הבין ממברנלי.
ה-$FADH_2$ נוצר במעגל קרבס על ידי אנזים ממברנלי. אותו אנזים הוא חלק מקומפלקס 2 של שרשרת מעבר האלקטרונים, והוא יקח את האלקטרונים של $FADH_2$. הוא לא משחרר פרוטונים אל התווך הבין ממברנלי.
קומפלקסים 1 ו-2 יעבירו את האלקטרונים **לקו-אנזים Q**. הקו-אנזים Q עושה דיפוזיה בממברנה הפנימית ומגיע לקומפלקס 3. קומפלקס 3 יעביר את האלקטרונים בשרשרת ריאקציות **לציטוכרום C**, ויפלט ארבעה פרוטונים לתווך הבין ממברנלי.
הציטוכרום C נע בדיפוזיה לקומפלקס 4. הוא יעביר את האלקטרונים אל החמצן ויפלוט 2 פרוטונים.



המבנה של הקומפלקסים הוא מאוד שמור באבולוציה. לכן אפשר ללמוד מהמבנים בחיידקים או תרנגולות על המבנים אצלנו.

הריאקציה בקומפלקס 1: NADH מעביר אלקטרונים לקואנזים Q. במגיבים יש NADH וקואנזים Q מחומצן, שהופכים ל-NAD+ וקואנזים Q מחוזר.


$$\text{NADH} + \text{CoQ}\,(\textit{oxidized}) \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQ}\,(\textit{reduced})$$
$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.360\text{ V} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -69.5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

לריאקציה זו יש פוטנציאל חיזור של 0.36V. אלקטרונים עוברים מפוטנציאל חיזור נמוך לגבוה, משמע התגובה הזו ספונטנית.

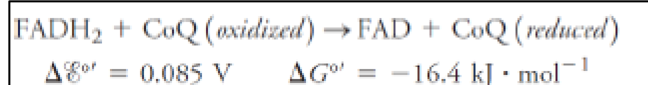
הבדלים בפוטנציאלי חיזור שקולים להבדלים באנרגיה חופשית. האנרגיה שנוצרת פה דומה מאוד לזו הנחוצה ליצירה של ATP.

קומפלקס 1 נקרא NADH-coenzyme Q oxidoreductase. הוא מורכב מזרוע שמעוגנת בממברנה וזרוע שחופשית במטריצה. הוא מכיל מולקולה אחת של FMN (פלאבין-קואנזים שמאפשר תגובות חמצון חיזור), ובין 8-9 צבירי ברזל-גופרית ביניהם האלקטרונים מדלגים. בכל ריאקציה, ה-NADH ימסור את שני האלקטרונים שלו לקואנזים Q.

גם ה- FMN וגם הקואנזים Q יכולים להימצא ב-3 מצבים : מחומצנים, מחוזרים ורדיקלים חופשיים. לעובדה זו יש תפקיד מהותי במעבר האלקטרונים.

הפרוטונים מדלגים לתווך הבין ממברנלי דרך מולקולות מים שקשורות בקשרי מימן לקבוצות בחלבון. הרצפים של אזורים בהם הפרוטונים יכולים לדלג נקראים **proton wires**. הפרוטונים זורמים כנגד מפל הריכוזים שלהם בתהליך הזה, והם מנצלים את תנועת האלקטרונים לשם כך (הם עוברים בכיוון הפוך מהאלקטרונים- החוצה אל התווך הבין ממברנלי, בעוד שהאלקטרונים נכנסים למטריקס).

הריאקציה בקומפלקס 2 : $FADH_2$ מוסר אלקטרונים לקואנזים Q. המגיבים $FADH_2$ וקואנזים Q מחומצן, שהופכים ל-FAD וקואנזים Q מחוזר. לריאקציה זו פוטנציאל חיזור יותר נמוך, סביב 0.01V, אבל היא גם ספונטנית.


$$\text{FADH}_2 + \text{CoQ}\,(\textit{oxidized}) \rightarrow \text{FAD} + \text{CoQ}\,(\textit{reduced})$$
$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.085\text{ V} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -16.4\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

קומפלקס 2 נקרא succinate-coenzyme Q oxidoreductase. בתוך הקומפלקס יש את האנזים סוצינט דה-הידרוגנז, שהוא חלק ממעגל קרבס. הוא מעוגן בממברנה וקשור קוולנטית ל-FAD. גם פה האלקטרונים עוברים דרך מרכזי ברזל-גופרית. צריך להדגיש שקומפלקס 1 עובד במקביל לקומפלקס 2.

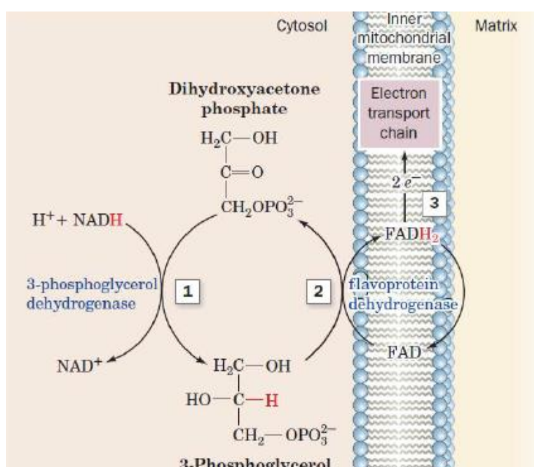
* איך משתלבים ה-NADH שנוצרו בגליקוליזה ונותרו בציטופלסמה?

אין טרנספורטר ל-NADH ולכן צריך להמיר אותו דרך קופקטורים נוספים.

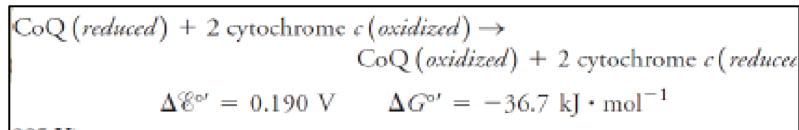
גליצרופוספט שאטל לוקח את ה-NADH ובשרשרת של 2 תהליכים הוא מתחבר לקומפלקס 2 ומעביר את האלקטרונים לקואנזים Q. בדרך יש מעבר ב-$FADH_2$.

התהליכים קורים בתווך הבין ממברנלי.

השאטל יכול לחצות את הממברנה החיצונית כי הוא עובר בפורות.

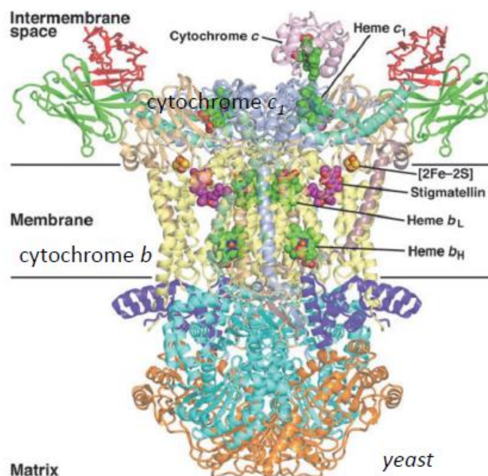


הריאקציה בקומפלקס 3: קואנזים Q מחוזר מעביר את האלקטרונים דרך קומפלקס 3 לציטוכרום C. משתתפים בתגובה 2 ציטוכרום C על כל קואנזים Q אחד. ציטוכרום C יכול לקבל רק אלקטרון אחד, בעוד שהקואנזים Q יכול לשאת 2 אלקטרונים, ולכן קומפלקס 3 הוא נחוץ. לתגובה פוטנציאל חיזור סביב 0.2V. היא ספונטנית.



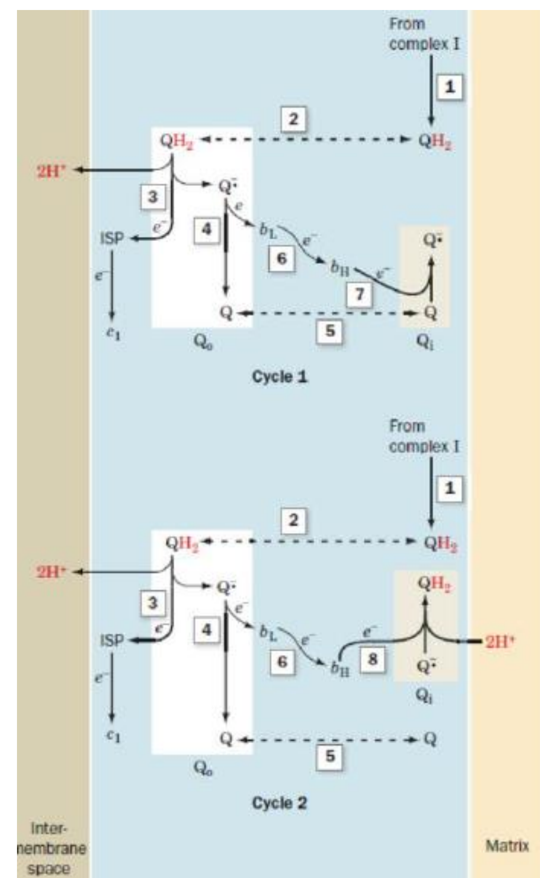
$$CoQ\,(reduced) + 2\text{ cytochrome } c\,(oxidized) \rightarrow CoQ\,(oxidized) + 2\text{ cytochrome } c\,(reduce$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.190\text{ V} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -36.7\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$



קומפלקס 3 נקרא coenzyme-Q-cytochrome c oxidoreductase. יש לו חלק שנמצא בתווך הבין ממברנלי, חלק מעוגן לממברנה הפנימית, וחלק במטריקס. הקומפלקס מורכב משני ציטוכרומי B שונים (b_L, b_H), וציטוכרום C1 וקומפלקס ברזל-גופרית אחד. בנוסף קשור אליו ציטוכרום C שיודע לעשות דיפוזיה (ה-C הוא נייד, ה-C1 מקובע לקומפלקס).

כאמור פה יש מעבר מזוג אלקטרונים (על קואנזים Q) לאלקטרון בודד (על ציטוכרום C). התהליך נקרא **Q cycle**.



שלבי המעגל:

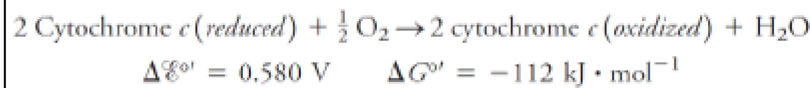
1. קואנזים Q עם 2 אלקטרונים (QH_2) מגיע לקומפלקס.
2. הוא נקשר לציטוכרום B.
3. ציטוכרום B מוביל אותו בתוך הקומפלקס לעבר הקומפלקס ברזל-גופרית, שיכול לעבור חיזור- לקבל אלקטרון מהקואנזים Q. את האלקטרון הזה הוא יעביר לציטוכרום C1. כרגע, הקואנזים Q נתן אלקטרון 1, ולכן הוא הפך לרדיקל. בנוסף שני פרוטונים נמסרים לתווך הבין ממברנלי.

4+5. הקואנזים Q רדיקל מוסר את האלקטרון ל- b_L והופך לקואנזים מחומצן (פשוט Q) והוא יעבור דיפוזיה.

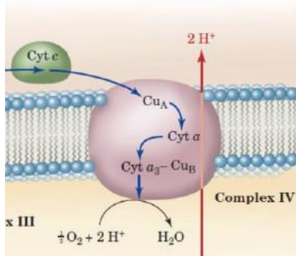
6. ה-b_L יעביר את האלקטרון ל- b_H.
7. ה-b_H ימסור את האלקטרון הזה חזרה לקואנזים Q. יש לו שתי אופציות. אופציה ראשונה (איור עליון)- להחזיר אותו ל-Q מחומצן (אותו Q שעבר דיפוזיה בשלב 5), מה שיהפוך שוב לרדיקל שיכול לחזור חזרה לשלב 4, לכן זה תהליך מעגלי.
8. אופציה שנייה (איור תחתון)- ה- b_H ימסור את האלקטרון לקואנזים רדיקל, ואז הוא יהפך ל-QH_2, שיכול לעבור שוב את התהליך מהתחלה ולמסור עוד אלקטרון לציטוכרום C1 ולשלוח שוב שני פרוטונים לתווך הבין ממברנלי.

עם התקדמות התהליך יצטברו רדיקלים חופשיים של Q. לכן, לאחר זמן מה, תהיה העדפה לאופציה השנייה- מסירת של האלקטרון שעל ה-b_H לרדיקל ויצירה של עוד ציטוכרום C1+העברת פרוטונים לתווך הבין ממברנלי.
כמובן שישנה סכנה לתאים שיש רדיקלים חופשיים שנוצרים בתהליך הזה. הם כן מסוגלים לעשות נזק לרקמות, וזה החסרון של נשימה תאית.

הריאקציה בקומפלקס 4 : ציטוכרום C מוסר את האלקטרון שלו לחמצן ונוצרים מים. 4 ציטוכרומים C צריכים לעבור חמצן על מנת לחמצן O_2 אחד. לתגובה פוטנציאל חיזור של בערך 0.6V, ו-ΔG מאוד שלילי- היא מאוד ספונטנית.



$$2\ \text{Cytochrome}\ c\,(reduced) + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow 2\ \text{cytochrome}\ c\,(oxidized) + H_2O$$
$$\Delta\mathcal{E}^{\circ\prime} = 0.580\ \text{V} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -112\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$



הקומפלקס מכיל ציטוכרום וציטוכרום3a מחומצנים, ושני מרכזי נחושת שכל אלו יכולים לחזר. האלקטרונים עוברים מאחד לשני בשרשרת עד לחמצן.

על כל מולקולת חמצן, ארבעה פרוטונים מועברים מהמטריצה לתווך הבין ממברנלי.

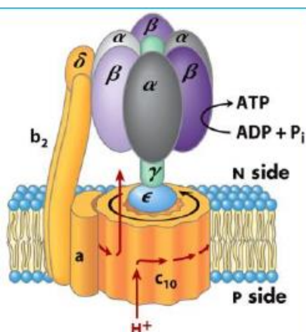
אם בוחנים את כל התגובות הללו, הדלתא G הכולל הסטנדרטי של פירוק NADH אחד לחמצון חצי מולקולת O_2 הוא כ-218- קילוג׳אול. כדי ליצר מולקולה אחת של ATP בתנאים סטנדרטים צריך כ-30KJ, ולכן היינו מצפים שממולקולה אחת של NADH יווצרו קצת יותר מ-7 מולי ATP, בעוד שבפועל נוצרות 2.5 מולקולות ATP. כלומר היעילות של התגובה היא רק 35%. בתנאים פיסיולוגים, הנצילות של התהליך הוא 70%, שזה אחוזים מאוד טובים.

תרגום מפל האלקטרונים ליצירת ATP :

התיאוריה הכימיואוסמטית אומרת שה-ATP נוצר תוך ניצול מפל הפרוטונים שנוצר בשרשרת מעבר האלקטרונים. הדלתא G של מעבר פרוטון מעבר לצידי הממברנה מושפע ממפל המתחים ומפל ריכוזים משני צידי הממברנה, בקשר הבא :

$$\Delta G = 2.3\ RT[\text{pH}\ (side\ 1) - \text{pH}\ (side\ 2)] + Z\mathcal{F}\Delta\Psi$$

ניקח דוגמא מה שקורה במיטוכונדריה. הפרש המתחים מצידי הממברנה הוא כ-0.17V. ה-pH במטריקס גבוה בערך בחצי מאשר בתווך הבין ממברנלי. אם מכניסים את זה לנוסחא יוצא שבמעבר של פרוטון אחד לתוך המטריקס (ב-37 מעלות) האנרגיה החופשית היא כ-21.5 KJ/mol. על מנת ליצור ATP בתנאים פיסיולוגים יש צורך בכ-40-50 KJ/mol (יותר גבוה מתנאים סטנדרטים). לכן מעריכים שצריך כ-3 פרוטונים על מנת לסנתז ATP אחד.

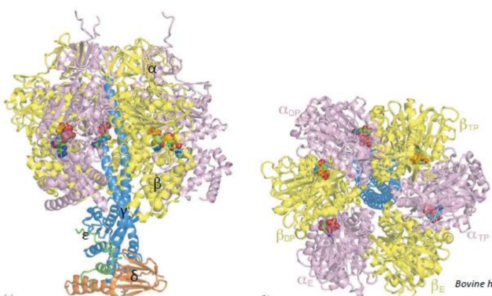


משאבת ה-ATP synthase : משאבה זו משתמשת בזרם הפרוטונים שנעים חזרה למטריקס מהתווך הבין ממברנלי ומנצלת אותו ליצירה של אנרגית מכנית- יש חלק של המשאבה שמסתובב כמו מנוע עקב זרם הפרוטונים.

הדוגמא במצגת היא על המשאבה ב-E.coli.

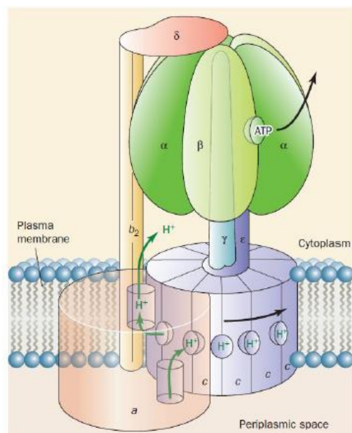
לחלבון יש שתי תת יחידות : F1, שנמצאת במטריקס, ו-F0 שמעוגנת בממברנה ואינה מסיסה. כל אחת מהן מורכבת מכמה תת יחידות. היחידות של F1 נקראות אלפא עד אפסילון (יש לו 5 תת יחידות).

והיחידות של F0 נקראות a-j (יכולות להיות עד 8 תת יחידות, ל-E.coli יש 3).



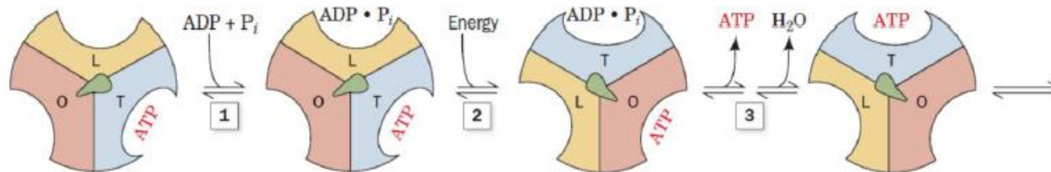
במבט צד, ל-F1 צורה של סוכריה על מקל. במבט על למבנה יש סימטריה משולשת של יחידות אלפא-ביתא. הסימטריה הזו היא מבנית בלבד. כל זוג של אלפא-ביתא הוא שונה פונקציונלית, והאפיניות שלהם ל-ATP ו-ADP שונה, בגלל הצורה המרחבית שלהם.

ב-E.coli , ה-F0 מכיל יחידת a אחת, 2 יחידות b ו-12 יחידות c. יחידות ה-c יוצרות טבעת, זה החלק המעוגן בממברנה. מספר היחידות נע בין 10 ל-15 בין יצורים שונים.



בשביל מנוע סיבובי צריך שני חלקים-אחד שמסתובב ואחד שעומד במקום. טבעת ה-C מסתובבת בממברנה, ואיתן מסתובבת הגמא והאפיסלון של ה-F1. הגמא והאפסילון מחוברות עליהן כמו מוט. החלק של האלפא-ביתא ב-F1 נשאר במקום ולא מסתובב, וזה החלק בו נוצר ה-ATP. התיאוריה המרכזית אומרת שהפרוטונים שבתווך הבין ממברנלי מגיעים דרך תעלה ונקשרים ליחידות ה-c של ה-F0. ליחידות c יש שני מצבים מרחביים, והקשירה של הפרוטון מעבירה אותם ממצב אחד לשני. השינוי מרחבי שמתרחש עם הקישור של הפרוטון ליחידת c, דוחף את הטבעת באופן יחסי לחלקים הקבועים- וזה מייצר את תנועת הסיבוב. לאחר שינוי הקונפורמציה, יחידת c חדשה תפנה אל התעלה ותוכל לקשור גם היא פרוטון (ב-E.coli יכולים להיקשר 12 פרוטונים). בסופו של דבר כל פרוטון יעשה סיבוב שלם, עד שיגיע לתעלה שנמצאת בצד השני מהצד שבו נכנס, ואז הוא ישתחרר מה-c לתוך המטריקס.

ה-F1 כאמור בנוי מחלק בעל סימטריה מרחבית, המורכב מיחידות פונקציונליות של אלפא-ביתא, שיכולות לקשור ATP או ADP. באיור רואים את ה-F1 במבט על, כל צבע מייצג צמד אחד של אלפא-ביתא, וכל אחד מהם נמצא במצב מרחבי אחר : O (פתוח), T (קשור חזק), L (קשור חלש), שלהם אפיניות שונה אל ה-ATP. במהלך הסיבוב של הטבעת c עם המוט גמא-אפיסלון, יחידת הגמא שבאה במגע עם יחידות האלפא-ביתא משרה בהם שינויים מרחביים, וזה משרה את השינוי באפיניות ל-ATP/ADP. למעשה הסיבוב המכני מתורגם לסיבוב פונקציונלי.



בתוך האילוסטרציה, בשלב הראשון, ATP קשור באופן חזק ליחידה במצב T, ובשתי היחידות האחרות לא קשור כלום. בשלב הבא מגיעים פוספט ו-ADP ונקשרים באופן חלש ליחידה במצב L. אז מתרחש הסיבוב של הטבעת c, ומושרה שינוי קונפורמציה ביחידות אלפא-ביתא. כתוצאה מכך, האתר שהיה L הופך ל-T, והאתר שהיה T הופך ל-O, והאתר שהיה O הופך ל-L. ה-ATP שהיה בתוך היחידה T יכול כעת להשתחרר, ואילו ה-ADP נדחס באתר ה-T ביחד עם הפוספט והופכים ל-ATP. עם הסיבוב הבא, אותה מולקולת ATP תשתחרר, ומולקולה אחרת תיווצר. לשים לב, אילו היינו עוקבים אחרי מולקולת ADP/ATP אחת היא לא הייתה זזה, היא פשוט כל פעם הייתה קשורה ליחידה במצב מרחבי אחר.

ב-E.coli כל סיבוב מלא של הטבעת c מייצר שלושה ATP, ולכן, כל פרוטון מייצר 1/4 מולקולות ATP (אלו הן הערכות, לא הוכח ודאית).

בקרה על זרחון חמצני :

רגולטורים שנצפה שיהיו פה הם כמות ה-ATP בגוף וכמות ה-ADP, והיחסים בין NADH ו-NAD^+ (גם רמת גלוקוז, pH אבל זה פחות).

אדם ממוצע צורך בין 1500-2000 קילוקלוריות ביום, וזה שקול להידרוליזה של כ-200 מול ATP. כמות ה-ATP הנתונה בגוף בכל רגע היא 0.1 מול, וזאת בגלל שאנחנו כל הזמן מנצלים את האנרגיה שיצרנו.

בתהליכים הקודמים, כדי למצוא את נקודות הבקרה העיקריות, הסתכלנו על אותן ריאקציות שנמצאות רחוק משי״מ. שם חייבת להיות בקרה רצינית, כי לא ניתן לבקר את התגובה רק על פי יחסי תוצרים/מגיבים.

נתמקד בשלב בו ציטוכרום C מעביר את האלקטרונים לקומפלקס 4 כדי לחזר את החמצן. זה ה-rate limiting step. זה תהליך שהוא בלתי הפיך, ותלוי בריכוזי הציטוכרום C. היחס בין הצורה המחוזרת והמחומצנת של ציטוכרום C ($[c^{2+}]/[c^{3+}]$) יקבע את הקצב של התגובה. ככל שיש יותר צורה מחוזרת של ציטוכרום C, הקצב של התגובה יעלה. היחס הזה קשור ליחס בין ה-$NADH/NAD^+$ והיחס בין ADP+Pi/ATP בתא באופן הבא : (אפשר לראות מדוע אם מסתכלים על הריאקציה נטו של זרחון חמצוני).

$$\frac{[c^{2+}]}{[c^{3+}]} = \left(\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]}\right)^{1/2} \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} K_{eq}$$

כאשר מעלים את היחסים האלו (שזה אומר פחות ATP ויותר ADP, פחות NAD^+ ויותר NADH), הקצב של הריאקציה עולה.

מכאן, שלא מספיק להסתכל רק על כמות ה-NADH או ה-ATP במערכת כדי להבין אם הריאקציה תתרחש. חשוב לבחון את היחס שלהם ל-ADP ו-NAD^+.

שני חסרונות מרכזיים של נשימה:

תחילה, כשאין חמצן אנו בצרות. יש אורגניזמים שיודעים לעשות גם נשימה אנ-אירובית, ולכן יוכלו לשרוד בסביבה אנ-אירובית. בחיות זה לא מתאפשר, תוך סדר גודל של דקות כבר יהיה נזק לרקמות.

שנית, לתהליך הנשימה יש תוצר לוואי של רדיקלים חופשיים. ה-Q cycle היה דוגמא אחת. יש רדיקלים נוספים בתהליך. ROS-reactive oxygen species הם הרדיקלים המזיקים שמעורבים בהזדקנות ובפתוגינזה של הרבה מחלות- אלצהיימר, פרקינסון ועוד. אחד הרדיקלים המרכזיים הוא חמצן. רדיקל חופשי מסתובב עם אלקטרון ומחפש להשלים לשני אלקטרונים. הוא יכול להיקשר למולקולות שונות באופן רנדומלי, ולמסור להם את האלקטרון או לקחת מהם אלקטרון (כך להפוך אותן לרדיקליות). יש מנגנונים רבים בתא שמיועדים להתמודד עם הרדיקלים החופשיים.

לסיכום, ראינו ארבעה מעגלים מטבולים, שהתחילו בגלוקוז והסתיימו ב-ATP. השאלה הבאה היא מאיפה מגיע הגלוקוז.

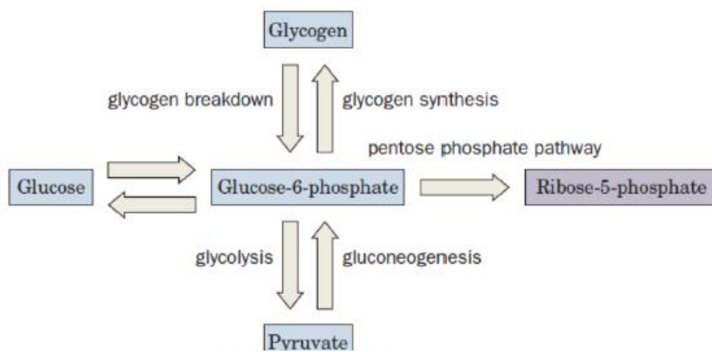
גליקוגן וזמינות גלוקוז

בחיות, שמרים ובקטריות, גליקוגן מהווה מקור אחסון לגלוקוז. בצמחים זה עמילן.

הגוף מקבל גלוקוז מהמזון, אבל מאחר ואנחנו לא אוכלים בכל שעה, צריך שלגוף תהיה אפשרות לאגור את הגלוקוז לשעת הצורך. בכבד יש גרנולוגות בהן מאוחסן הגליקוגן. הניוד של הגלוקוז מהגליקוגן המאוחסן בכבד, מאפשר אספקה סדירה של גלוקוז בשעות הצום. אבל כמות הגליקוגן המאוחסנת בכבד מספיקה לחצי יום של צום. לכן, לאחר סיום של המאגרים האלו, מתחיל תהליך של פירוק גלוקוז ממקורות אחרים כמו שומן, וייצור של גלוקוז בתהליך של גלוקונאוגינזה.

הרקמות שצורכות הכי הרבה גלוקוז הן המוח ורקמות סרטניות.

שימושי הגלוקוז:



גלוקוז הופך לגלוקוז-6-פוספט. אם ה-G6P ילך לגליקוליזה הוא יהפוך לפירובט. אבל יש לו אפשרות להיכנס למסלול הפנטוז-פוספט ולהפוך לריבוז-5-פוספט (מרכיב של נוקלאוטידים), ואפשרות אחרת להפוך לגליקוגן לצורך אחסון.

הגליקוגן יוכל להתפרק ל-G6P בחזרה (רק 10% מיחידות הגליקוגן שנשברות הן גלוקוז, השאר הן G6P).

כמו כן, הפירובט יכול להפוך בחזרה ל-G6P בגלוקוניאוגינזה.

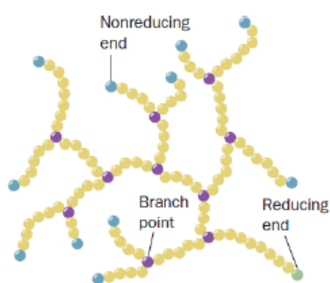
כל המערכות האלו מדברות אחת עם השנייה, בעיקר דרך בקרה הורמונלית.

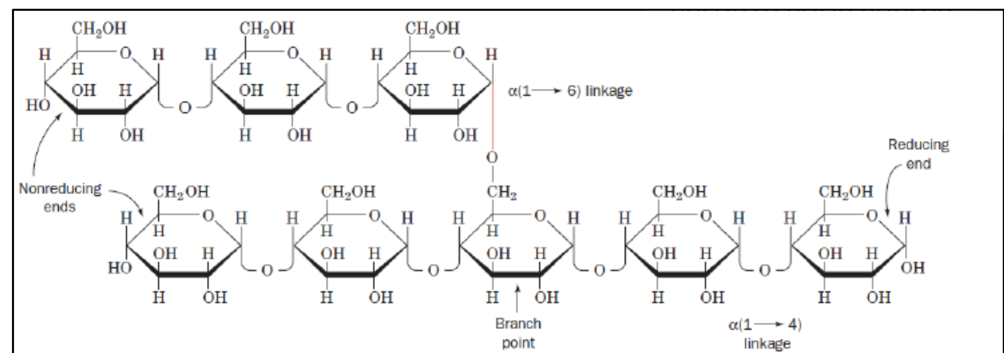
מבנה הגליקוגן:

פולימר של D-גלוקוז, המחוברים בקשרי α1,6 ו-α1,4. זה אומר שפחמן מספר 1 של גלוקוז מסוים יכול להיקשר לפחמן 4 או 6 של גלוקוז אחר. קישור עם פחמן 4 יתן שרשרת ישרה, וקישור עם פחמן 6 יתן הסתעפות כלפי מעלה. כתוצאה מכך מבנה הגליקוגן הוא לא סימטרי, יש עליו כל מיני נקודות פיצול (בקשרי 1-6). זה קורה בערך כל 8-14 יחידות.

יש לו שני קצוות: קצה reducing וקצה לא reducing. הקצה ה-reducing הוא ההתחלה של הגליקוגן, והקצה ה-non reducing הוא הסוף. לכל גליקוגן יהיו כמה קצוות non-reducing, בגלל ההסתעפויות, אבל רק קצה reducing אחד.

יחידות גלוקוז יכולות להצטרף או להישבר מהגליקוגן רק בקצה ה-non reducing.





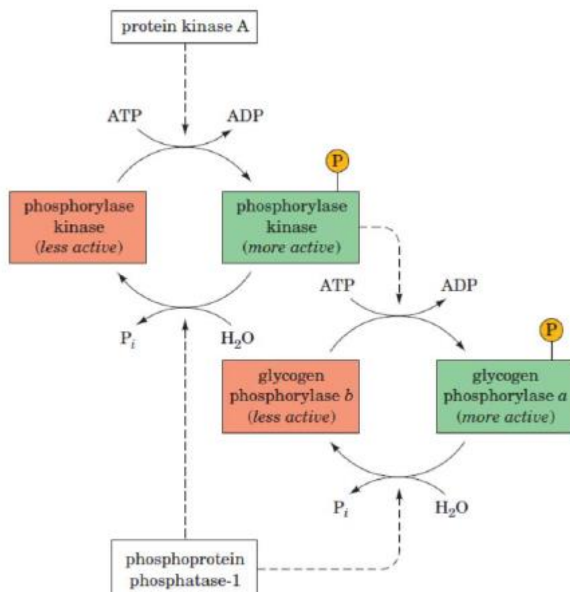
המבנה של הגליקוגן הוא מאוד מסועף, והוא יכול להתקיים בגרנולות ספריות של הכבד, שהן באורך 100-400 אנגסטרם בלבד, שכל אחת תכיל כ-120,000 יחידות גלוקוז. הגרנולות מכילות גם חלבונים שמעורבים ביצירה והשבירה של הגליקוגן. המבנה המסועף תורם ליכולת הניוד של הגלוקוז, כי יש הרבה נקודות קצה מהן אפשר להוציא גלוקוז ולחבר אליו גלוקוז, וזה מאפשר נקודת ממשק נוחה עם האנזימים.

שבירה של גליקוגן דורשת 3 אנזימים:

1. גליקוגן פוספורילז. הוא מקטלז שבירה של יחידה אחת. הוא יכול לעבוד רק אם היחידה מרוחקת לפחות ב-5 יחידות מנקודת פיצול. לאחר השבירה נותר גלוקוז-1-פוספט.
2. פוספו-גלוקומוטז הופך את הגלוקוז-1-פוספט לגלוקוז-6-פוספט. הוא עובד עם קו-פקטור ser. בדרך נוצר חומר ביניים של בי-פוספט.

3. Glycogen debranching enzyme-אנזים זה מוריד יחידות פיצול, ומאפשר לגליקוגן פוספורילז להגיע ליחידות שאחרת לא היו לו גישה אליהם. הוא עושה זאת על ידי כך שהוא מוריד 3 יחידות משרשרת שהיא בת 4 יחידות (זה נחשב ענף מגביל, כי הוא לא יכול להיות מפורק ע״י גליקוגן פוספורילז), ומדביק אותן לשרשרת אחרת, ואז השרשרת החדשה מספיק ארוכה לפירוק. בנוסף, את היחידה שנותרה קשורה בקשר 1-6 הוא מפרק ונותר גלוקוז.

הקצב המקסימלי של גליקוגן פוספורילז הוא גדול בהרבה מזה של גליקוגן debranching. זה אומר שברגע שצריך גלוקוז במיידי, כל הגלוקוז שהיה זמין ללא צורך ב-debranching נשבר. התהליך יתקע עד שה-debranching יוכל להספיק לבצע את פעולתו. זו אחת הסיבות שהשרירים לא יכולים להפעיל כוח רב ליותר ממספר שניות.



בקרה על שבירת גליקוגן:

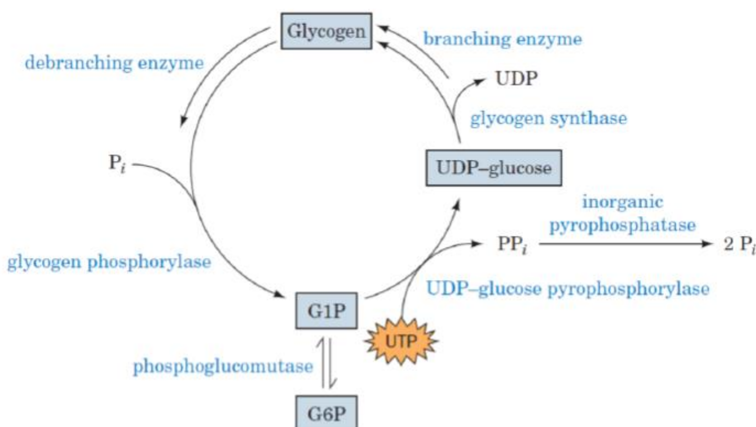
גליקוגן פוספורילז יכול להימצא בשני מצבים- מזורחן (ואקטיבי) ולא מזורחן (פחות אקטיבי). המעבר ממצב לא אקטיבי לאקטיבי מבוקר על ידי קסקדה של ריאקציות זרחון. פוספורילז קינז הוא האנזים שמעביר את הגליקוגן פוספורילז למצב אקטיבי. אותו פוספורילז קינז מבוקר על ידי PKA (כלומר הקינז עצמו צריך להיות מופעל בזרחון על ידי קינז אחר PKA). ה-PKA עובר רגולציה על ידי הורמונים. עבור כל התהליכים האלו קיימות גם פוספטזות ששמות את האנזימים במצב לא אקטיבי, והן גם מבוקרות ע״י סיגנלים הורמונלים.

ה-G6P שנוצר בשבירה הופך לגלוקוז, כדי שיוכל לצאת מהכבד לאיברים אחרים. כדי לנוע בדם הוא חייב להיות גלוקוז לא מזורחן (אם הוא נועד לשימוש של הכבד- בגליקוליזה, או למעגל הפנטוז-פוספט אז הוא ישאר G6P). זה נעשה על ידי אנזים גלוקוז-6-פוספטז. בתאי שריר אין את האנזים הזה, ולכן כל גליקוגן שהם יפרקו ישאר שלהם ולא יוכל לצאת לאיברים אחרים. אותו אנזים פוספטז נמצא ב-ER של תאי הכבד. ה-G6P נמצא בציטופלסמה. לכן צריך אנזים שיכניס את ה-G6P ל-ER (זה G6P טרנסלוקז), ועוד אנזים שיוצא אותו אל הדם (זה GLUT2). (אנזים GLUT1 הוא אנזים שמכניס גלוקוז לתאים מהדם). יש המון מחלות גנטיות שקשורות בבעיות באנזימים האלו.

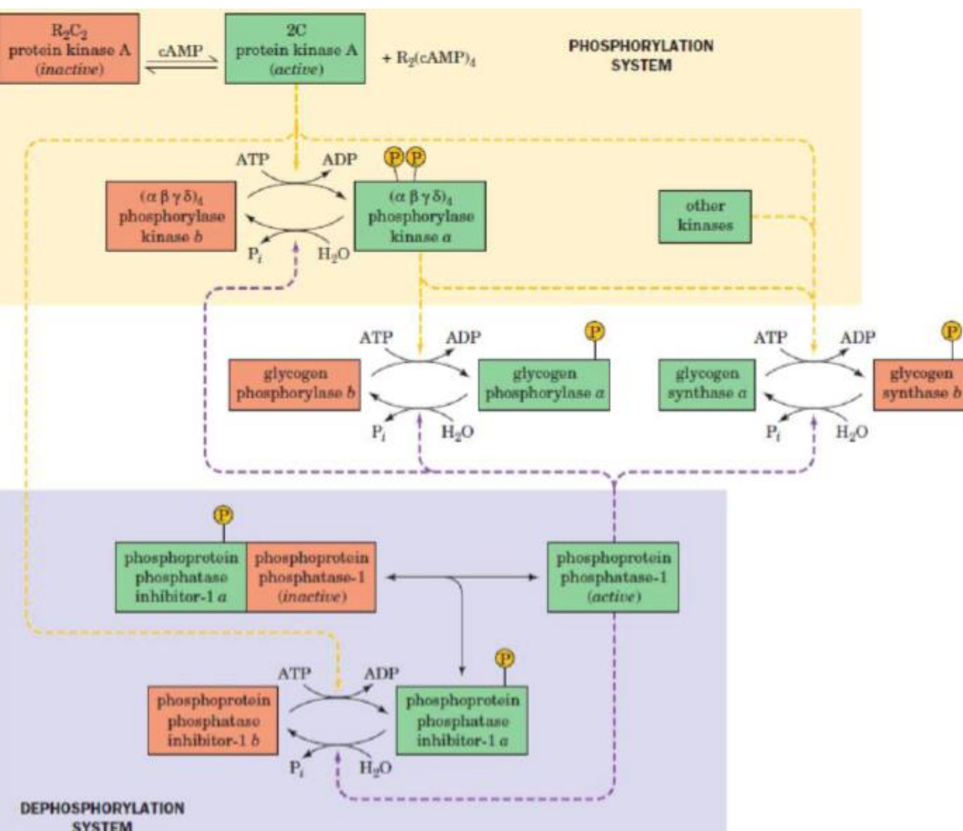
יצירה של גליקוגן דורשת אנרגיה.

1. תחילה, ה-G6P הופך ל-G1P (ע״י מוטז).
2. ה-G1P יגיב עם UTP, והם יהפכו ל-UDP גלוקוז.
3. גליקוגן סינתטז יוציא את ה-UDP ויעמיס את הגלוקוז על הגליקוגן.
4. בנקודות ההסתעפות, אנזים branching מעמיס את הגלוקוז על הגליקוגן (אחרי שה-UDP יצא).

על כל גלוקוז שמועמס לגליקוגן משלמים ב-UTP (זה שקול לצריכת של ATP).



בקרה על היצירה של גליקוגן :



הזכרנו את הגליקוגן פוספורילז, שמשתתף בפירוק של הגליקוגן, והבקרה שלו על ידי פוספורילציה בשרשרת ריאקציות.

cAMP אחראי לבקרה של PKA, הקינזה הראשונה בשרשרת (היא מפעילה עוד קינזה, שעושה אקטיבציה לגליקוגן פוספורילז).

מערכת הדה-פוספורילציה (שמעבירה את הגליקוגן פוספורילז למצב לא אקטיבי) נשלטת גם על ידי ה-PKA. ה-PKA הפעיל יגרום לעיכוב של המערכת שעושה דה-פוספורילציה, גם דרך קסקדה (זה באיור הסגול).

מבלבד ההשפעות של ה-PKA על הגליקוגן פוספורילז, הוא מעכב את הפעילות של הגליקוגן סינתז, גם באופן ישיר וגם דרך קסקדה.

צריך לשים לב ולזכור שה-PKA מפעיל 3 זרועות- הפעלת מערכת הקינזות, עיכוב מערכת הפוספורילזות (כך תעודד שבירה של גליקוגן), ועיכוב הגליקוגן סינתז (כך תמנע סינתזה של גליקוגן). התוצאה הסופית של סיגנל שהפעיל PKA היא עלייה ברמת הגלוקוז.

הבקרה דרך קסקדה מאפשרת תיאום של ה-time scale של התהליכים. לעיתים נרצה שתהליך אחד יהיה בקצב שונה מהאחר, וזה יתאפשר אם נכניס עוד שלבים בדרך.

יש שלושה הורמונים שלוקחים תפקיד בבקרה על התהליכים הללו : אינסולין, גלוקגון ואפינפרין. לא צריך לדעת ספציפית את התהליכים של כל אחד, אבל צריך להבין את העקרון הכללי. אינסולין פועל כאשר יש הרבה גלוקוז בדם, הוא יקדם גליקוליזה בשריר, ובכבד יקדם סינתזה של גליקוגן (עושה אקטיבציה של גליקוגן סינתז)..

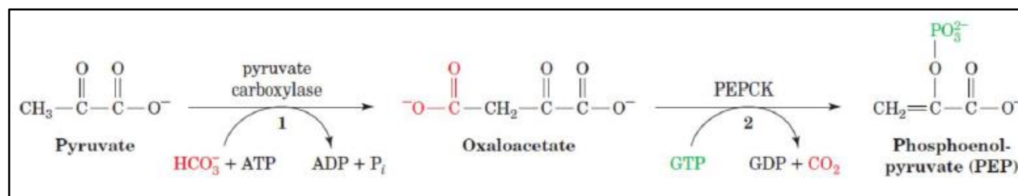
אפינפרין, בשריר ובכבד, מפעיל cAMP, שיפעיל את הקסקדה לפירוק גליקוגן.

<u>גלוקוניאוגינזה</u>

הכבד והכליות יודעים לסנתז גלוקוז מלקטט, פירובטים וחומצות אמינו.

גלוקונאוגינזה היא תהליך מראה לגליקוליזה, למעט בשלבים הבלתי הפיכים (1,3,10), שם נצטרך מעקפים להתגבר על המחסום האנרגטי.

שלב ראשון : מעבר מפירובט לפוספואנול-פירובט (PEP), דרך תוצר ביניים אוקסלואצטט (ממעגל קרבס). זה נעשה בשני שלבים : פירובט קרבוקסילז מוסיף קבוצת פונקציונלית של CO_2 לפירובט (נותן אוקסלואצטט). זה שלב שצורך ATP. לאחר מכן קרבו-קינז מוסיף קבוצת זרחן על האוקסלואצטט תוך ניצול של GTP. קבוצת ה-CO_2 יורדת. הסיבה לכך שיש קרבוקסילציה ואז דה-קרבוקסילציה היא משום שהמעבר מפירובט ל-PEP הוא מאוד אנדותרמי. השימוש בתגובות הביניים, תוך ניצול ATP ו-GTP מאפשר התגברות על המחסום האנרגטי. לתגובה הנ"ל ΔG קרוב לאפס.



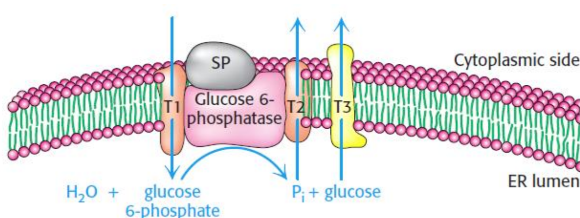
הריכוז של האוקסלואצטט לא תלוי רק בקצב הריאקציות עצמן, אלא גם ביכולת של האוקסלואצטט המיטוכונדריאלי לצאת לציטופלסמה. כדי לצאת לציטופלסמה, הוא צריך לעבור דרך חומר ביניים מאלט. לשם כך, אנזים מיטוכונדריאלי בשם מאלט דה-הידרוגנז יהפוך אותו למאלט, תוך ניצול NADH. המאלט יחצה את הממברנה של המיטוכונדריה, ובציטופלסמה יהפוך חזרה לאוקסלואצטט על ידי אותו האנזים, אך הפעם כשהוא קשור ל-NAD^+. למעשה בטרנספורט הזה "תתבזבז" מולי NADH מיטוכונדריאלית, ותיווצר מולי NADH ציטופלסמטית, שנחוצה לשלבים הבאים של גלוקוניאוגינזה.

שלב שני-שביעי, תשיעי : אלו ריאקציה בש"מ שיתרחשו לפי יחס מגיבים/תוצרים. האנזים אותו אנזים מגליקוליזה.

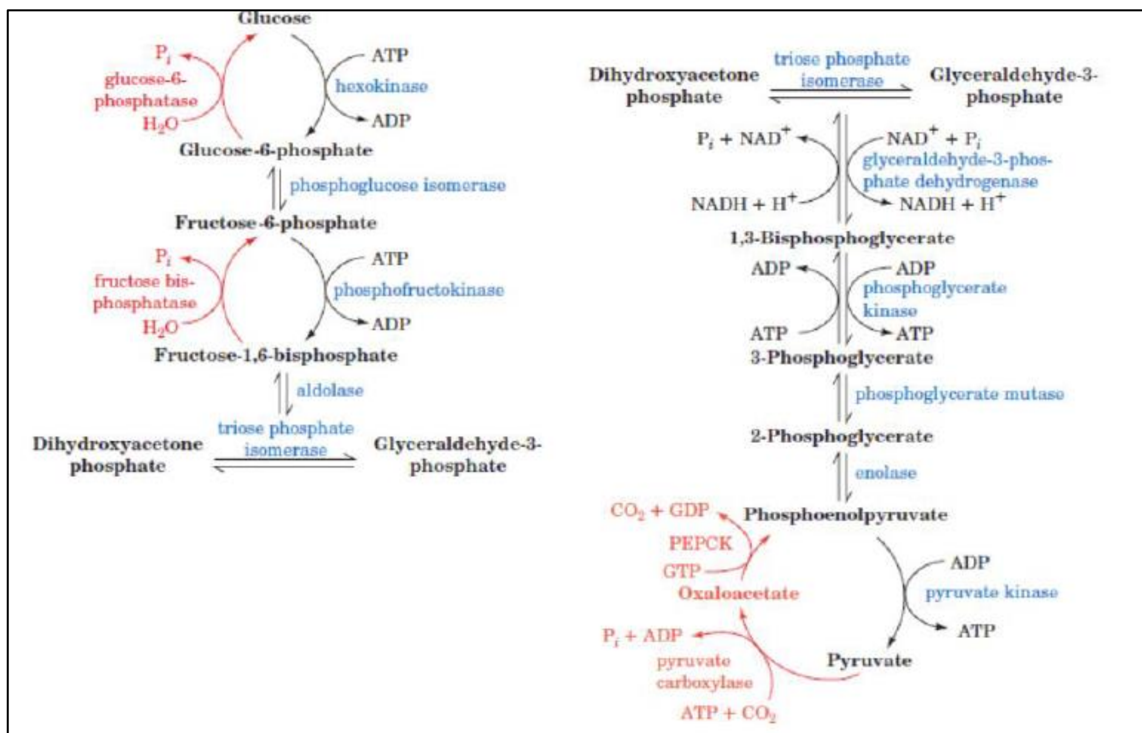
שלב שמיני : מעבר מפרוקטוז-1,6-ביפוספט ל-F6P, בעזרת אנזים פרוקטוז-ביפוספטאז. זה אנזים אלוסטרי.

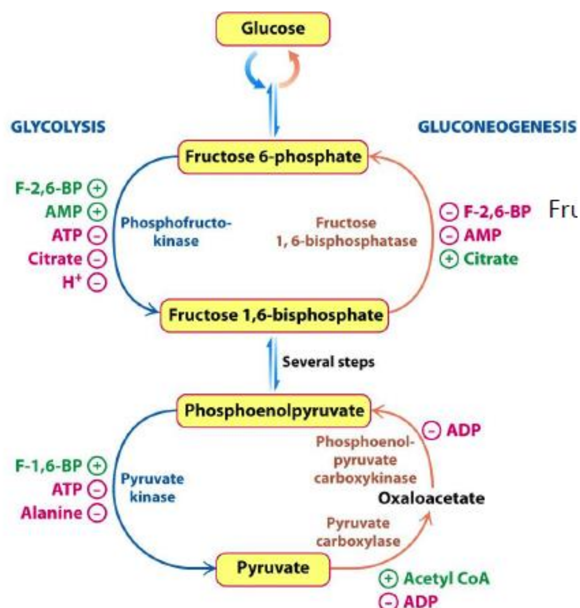
שלב עשירי : גלוקוז-6-פוספט הופך לגלוקוז, אנזים גלוקוז-6-פוספטאז (אותו אנזים שהוזכר בשבירה של הגליקוגן). התגובה הזו לא תתרחש בכל התאים. ברוב הרקמות גלוקוניאוגינזה תעצר בגלוקוז-6-פוספט, שיכול לעבור את מסלול הפנטוז-פוספט או להיאגר כגליקוגן (זה לרוב מה שיקרה). הסיבה לכך היא שהפוספטאז הנ"ל מבוטא רק ברקמות שתפקידם לשמר את ההומאוסטזיס של ריכוז הגלוקוז בדם- שזה בעיקר הכבד וקצת הכליות. כמו כך, הביטוי שלו ברקמות האלו הוא מאוד מבוקר, וקשור גם לביטוי של ההקסוקינאז- האנזים מגליקוליזה שאחראי על התגובה ההפוכה.

התהליך הזה מתרחש בלומן של ה-ER, ואנזים הפוספטאז הוא אנזים ממברנלי. לצורך פעילותו, הוא צריך אנזים מייצב (ה-SP), אשר תלוי בריכוזי הסידן. לאחר שנוצרו הפוספט והגלוקוז, הם ישובו אל הציטופלסמה בעזרת טרנספורטרים הפוכים- T2, T3, בהתאמה. צריך אם כך 5 אנזימים לשלב הזה-טרנספורטר שיכניס את ה-G6P ללומן, פוספטאז, אנזים מייצב SP, ושני טרנספורטרים שיחזירו את הגלוקוז לציטופלסמה.



סיכום התהליך : סה"כ כדי לעבור משני פירובטים לגלוקוז בגלקוניאוגינזה צריך 4 מולקולת ATP ו-2 מולקולות GTP.
לתהליך נטו יש ΔG שלילי. מאחר ובגליקוליזה הרווחנו 2 מולי ATP, אז המאזן האנרגטי של מחזור גלוקוז הוא מינוס 4 מולקולות אנרגיה. זה לא הגיוני לכאורה. ההסבר הוא שמקור הפירובטים האלו הוא לא מפחמימות! הם מגיעים ממקורות מזון אחרים, ומועברים לגלוקוז כי יש חסר שלו בגוף.





<u>בקרה על גלוקונאוגינזה וגליקוליזה:</u>

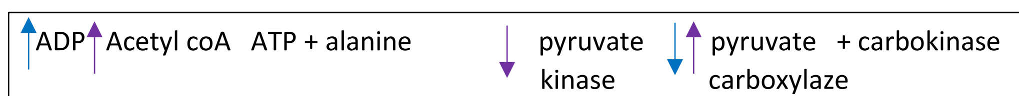
מבוקרים על ידי גורמים משותפים- מי שמזרז תהליך אחד מעכב את הנגדי. משום כך, בתוך תא, ברגע נתון, תהליך אחד מהם הוא דומיננטי. <u>כאשר התא זקוק לאנרגיה, גליקוליזה תועדף. כאשר התא לא זקוק לאנרגיה, גלקוניאוגינזה תועדף.</u>

הרגולטורים העיקרים הם מולקולות שמצביעות על מצב האנרגיה בתא- ATP, ADP, AMP, ומולקולות ביוסינטטיות הנוצרות בתהליכים הקטבולים- כמו ציטרט, אצטיל קו-A. יש שני צמתים מרכזיים של בקרה- מעבר מ-F6P ל-F-1,6-BP ומעבר מ-PEP לפירובט.

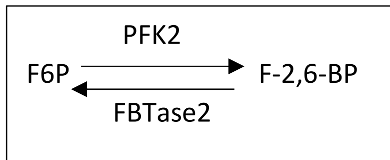
כאשר חסר אנרגיה, יהיה עודף ב-AMP. הוא יזרז את האנזים של הגליקוליזה- PFK, ויעכב את האנזים של הגלוקוניאוגינזה- הפוספטאז. לעומת זאת, עודף בציטרט (אחד מחומרי הביניים של מעגל קרבס), מלמד שיש כרגע הרבה אנרגיה בתא, כי הוא סימן שמתרחשת רספירציה. לו תהיה ההשפעה ההפוכה על שני האנזימים.



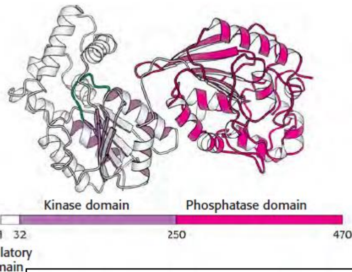
באופן דומה, עודף באציטל קו-A מלמד על פעילות נרחבת של רספירציה (כמו ציטרט), ולכן גם הוא מזרז גלוקוניאוגינזה דרך שפעול האנזים פירובט קרבוקסילז. באופן דומה, עודף באלנין וב-ATP מלמדים שיש מספיק תוצרי ביוסינתזה ואנרגיה, והם מעכבים את הפירובט קינז של הגליקוליזה. עודף ב-ADP קשור בחוסר באנרגיה בתא, לכן הוא יעכב את שני האנזימים שהופכים פירובט לPEP ויפחית את קצב הגלוקוניאוגיזה.



עוד מולקולה רגולטורית של התהליך היא פרוקטוז-2,6-ביפוספט (F-2,6-BP). לשים לב שהיא שונה מ- F-1,6-BP התוצר ביניים בגליקוליזה. אותו F-2,6-BP מאקטב את ה-PFK ולכן מעלה גליקוליזה, ומעכב את הפוספטאז המקביל אליו בגלוקוניאוגינזה.



ה-F-2,6-BP יכול להפוך לפרוקטוז-6-פוספט, שהוא תוצר ביניים של הגליקוליזה, על ידי דה-פוספורילציה. התגובה הזו מתקיימת גם לכיוון ההפוך- F6P הופך ל-F-2,6-BP על ידי זרחון. שתי הריאקציות האלו מזורזות על ידי קינז ופוספטאז : PFK2 ופרוקטוז-בי-פוספטז 2 (FBPase2). לשני האנזימים האלו תכונה מיוחדת- הם שניהם יושבים על אותו הפוליפפטיד, שלו יש גם יחידה רגולטורית בקצה ה-N טרמינלי. **אנזים זה הוא ביפונקציונלי**.



ברגע שהיחידה הרגולטורית מזורחנת, הדומיין הפוספטזי פעיל--> יש יותר F6P.

ברגע שהיחידה הרגולטורית אינה מזורחנת, הדומיין הקינזי פעיל --> יש יותר F-2,6-BP.

בזמן רעב, מופרש הורמון גלוקגון. בתאי הכבד הוא גורם להפעלת cAMP --> מזרחן PKA --> מזרחן את האנזים הביפונקציונלי --> ירידה ב-F-2,6-BP --> אנזים גליקוליזה PFK פחות פעיל + אנזים פוספטאז של גלוקוניאוגינזה יותר פעיל --> עליה ברמות הגלוקוז בדם.

לאחר ארוחה, מופרש הורמון אינסולין. הוא מפעיל ריאקציות תגובות שתוריד את הזרחון מהאנזים הביפונקציונלי --> תועדף גליקוליזה --> תרד רמת הסוכר בדם.

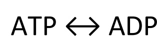
בנוסף, שני ההורמונים האלו יפעילו מסלולי העברת אותות שישנו את ביטוי של גנים הקשורים בריאקציות האלו. אינסולין יעלה ביטוי של אנזימים מהגליקוליזה (PFK, פירובט קינז) והאנזים הביפונקציונלי. גלוקגון יוריד את רמות הביטוי שלהם, ויעלה רמות ביטוי של אנזימים מגלוקוניאוגינזה. רגולציה דרך שעתוק היא הרבה יותר איטית מרגולציה אלוסטרית, מה שמעלה את המורכבות של אפשרויות הבקרה על אותם תהליכים מטבולים.

רגולציה זו היא דוגמא למחזור סובסטרט. המעבר בין F6P ו-F-2,6-BP מתבצע כל הזמן באופן דו כיווני בתאים, אבל אחד הוא דומיננטי יותר מהאחר. היתרון של שימוש ברגולטור אלוסטרי לשתי תגובות הפוכות הוא כאמור שליטה הרבה יותר רחבה בבקרה, מה שמאפשר תגובות מהירות יותר בתא למצבים סביבתיים, והגברה של הסיגנל, עד כדי פי 1000 במצבים של דרישה חמורה ב-ATP.

במצב פתולוגי, malignant hyperthermia, הבקרה על התהליכים משתבשת ושניהם מתרחשים באופן מהיר ובלתי נשלט. זה גורם לפירוק אינטנסיבי ומהיר של ATP, המייצר חום.

דוגמא לחישוב :

תגובה בכיוון אחד תייצר ATP, בכיוון ההפוך ADP.



נניח כי במצב מסוים התגובה הישירה תתן 100 מולק׳ והתגובה ההפוכה תתן 90 מולק׳. הנטו הוא 10 מולק׳ ATP.

שינוי של 20% בריכוז הרגולטור האלוסטרי תעלה את היצירה של ATP ל-120 מולק׳ ותוריד את היצירה של ADP ל-72 מולק׳. הנטו הוא 48 מולק׳ ATP- גידול של 380% משינוי של 20% באנזים האלוסטרי.

מעגל קורי : זרימת מטבולים בין השריר לכבד. גלוקוז מגיע מהדם, תאים בכבד יכולים לייצר ממנו פירובטים, גליקוגן, ריבוזים ועוד. ה-dead end המטבולי הוא לקטט, שנוצר בפרמנטציה הומולקטית. הלקטט יוצא מהשריר אל הכבד, ושם אפשר לייצר ממנו גלוקוז בגלוקונאוגינזה. אותו גלוקוז ישוב אל השרירים והם ייצרו עוד לקטט וחוזר חלילה. תאי דם אדומים הם חסרי מיטוכונדריה, ולכן גם יעשו פרמנטציה הומולקטית וייצרו לקטט.

ללקטט יש אפשרות נוספת. גם הוא וגם פירובט יכולים לצאת מתא השריר אל הדם בדיפוזיה ולהגיע לשריר הלב. על גבי תאי שריר הלב יש טרנספורטים שמחדירים אותם פנימה אל התאים, שם לקטט חוזר לפירובט, והולך למעגל קרבס ושרשרת מעבר האלקטרונים. מאחר ושריר הלב יכול לנצל את הלקטט והפירובט האלו כמקור אנרגיה, יש יותר גלוקוז זמין בגוף לשימוש השרירים במאמץ.

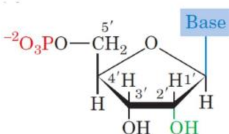
הכבד יודע לייצר גלוקוז גם מחומרי מוצא אחרים, למשל אלנין. בעת פעילות מאומצת בשריר, מפורקות חומצות אמינו כדי לקבל אנרגיה, והחנקנים העודפים מועמסים על פירובט ונוצר אלנין. אותו אלנין מגיע לכבד, שמחזיר אותו בתגובה ההפוכה לפירובט, ומשם לגלוקוז בגלוקוניאוגינזה. תהליך זה מסייע לאזן את רמות החנקן בגוף.

מעבר מלקטט לפירובט זו תגובה הפיכה שמזורזת בשני הכיוונים על ידי האנזים לקטט-דה-הידרוגנז. אנזים זה הוא טטרמר, שיכול להיות מורכב משילובים שונים של שתי תתי יחידות: H ו-M. היחידה H נפוצה יותר בתאי שריר הלב, והיחידה M נפוצה יותר בתאי שריר השלד. לכן יכולים להיות 5 צורות של האנזים: $H_4, H_3M_1, H_2M_2, H_1M_3, \text{and } M_4.$
הטטרמר שכולו H הוא בעל האפיניות הגבוהה ביותר לסובסטרט לקטט, והטטרמר שכולו M הוא בעל האפיניות הנמוכה ביותר ללקטט. הטטרמר שכולו M מעוכב אלוסטרית על ידי פירובט. לשאר הטטרמרים תכונות ביניים, כתלות בכמות יחידות ה-M וה-H.
בלב, האנזים יעביר את הלקטט שהגיע משרירים לפירובט, שיכנס לתהליכי הנשימה האירובים. בשריר, האנזים יזרז את התגובה ההפוכה --> פירובט יעבור ללקטט, וכך הגליקוליזה תוכל להמשיך (סילוק תוצר).

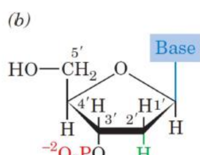
גליקוליזה וגלוקוניאוגינזה בהיבט האבולוציה: אפשר לחלק את הגליקוליזה לשני שלבים- השלב הראשון של הגליקוליזה של פירוק ההקסוזים, והשלב השני של פירוק טריאוזים. האנזימים של החלק הראשון לא שמורים באבולוציה, ומשתנים בין הזנים. בארכיאות הם כלל לא קיימים. האנזימים של החלק השני, מאוד שמורים באבולוציה. האנזימים בחלק השני (למעט האנזימים שמעבירים בין PEP ופירובט) הם זהים בין גליקוליזה וגלוקוניאוגינזה, וככל הנראה זה החלק העתיק יותר. האנזימים של החלק הראשון, השתנו לאורך האבולוציה כתלות בסוגי הסוכרים שהיו זמינים באותה העת.

נוקלאוטידים

נוקלאוטיד משמשים כמקור אנרגיה, וכאבני הבניין של ה-DNA וה-RNA.



5′-Ribonucleotide



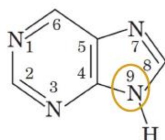
3′-Deoxynucleotide

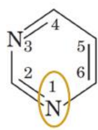
נוקלאוטיד בנוי מפנטוז הקשור לקבוצת פוספט, ומחובר בקשר קוולנטי לבסיס חנקני. בדומה לסוכרים, שהנומקלטורה שלהם הייתה בחוקיות מסוימת, כך גם בנוקלאוטידים.

הסוכר: הפחמנים של הפנטוז ממוספרים ב-'1 עד '5.

כאשר הפנטוז המצוי בנוקלאוטיד הוא D-ריבוז, הוא נקרא ריבונוקלאוטיד (משמש ל-RNA). כאשר הפנטוז הוא 2-דה-אוקסיריבוז (לפחמן '2 אין קבוצת הידרוקסיל), הנוקלאוטיד נקרא דה-אוקסיריבונוקלאוטיד (משמש ל-DNA).

הפוספט: הפוספט יכול להיות מחובר לפחמן '5 או פחמן '3 (ואז הוא יקרא 5'-nucleotide ו-3'-nucleotide).
יתכן גם שלא יהיה פוספט (ואז יקרא נוקלאוזיד).


Purine


Pyrimidine

הבסיס: הבסיסים מכילים טבעת חנקן. הפחמנים והחנקנים על הטבעת ממוספרים ללא פריים (׳). הם מתחלקים לשני סוגים: פורינים ופירמידינים. הקישור בין הבסיס לריבוז הוא תלוי במשפחה- פורינים מתחברים דרך חנקן 9, ופירמידינים מתחברים דרך חנקן 1.

הנומקלטורה של הבסיסים, הנוקלאוזידים והנוקלאוטידים:

מה שיתחבר לטבעת החנקנית הוא שיקבע את השם. ניקח דוגמא על הפורין אדנוזין- אם אל החנקן 9 בפורין נקשר מימן, זה יהיה אדנין. אם מחובר אליו ריבוז, הוא יהיה אנדוזין, ויחשב נוקלאוזיד. אם מחובר אליו ריבוז פוספט, הוא יהיה נוקלאוטיד AMP (ואם זה ריבוז עם שניים או שלושה פוספטים זה ADP ו-ATP, בהתאמה).

החוקיות דומה בגואנין, ציטוזין, אורציל וטימין.

Base Formula	Base (X = H)	Nucleoside (X = ribose[a])	Nucleotide[b] (X = ribose phosphate[a])
	Adenine Ade A	Adenosine Ado A	Adenylic acid Adenosine monophosphate AMP
	Guanine Gua G	Guanosine Guo G	Guanylic acid Guanosine monophosphate GMP
	Cytosine Cyt C	Cytidine Cyd C	Cytidylic acid Cytidine monophosphate CMP
	Uracil Ura U	Uridine Urd U	Uridylic acid Uridine monophosphate UMP
	Thymine Thy T	Deoxythymidine dThd dT	Deoxythymidylic acid Deoxythymidine monophosphate dTMP

מטבוליזם של נוקלאוטידים

רוב מרכיבי המזון מכילים נוקלאוטידים, אבל רק חלק קטן מהנוקלאוטידים במזון משולבים בחומצות הגרעין בתא. הגוף גם יודע לסנתז לבד נוקלאוטידים-דה נובו.

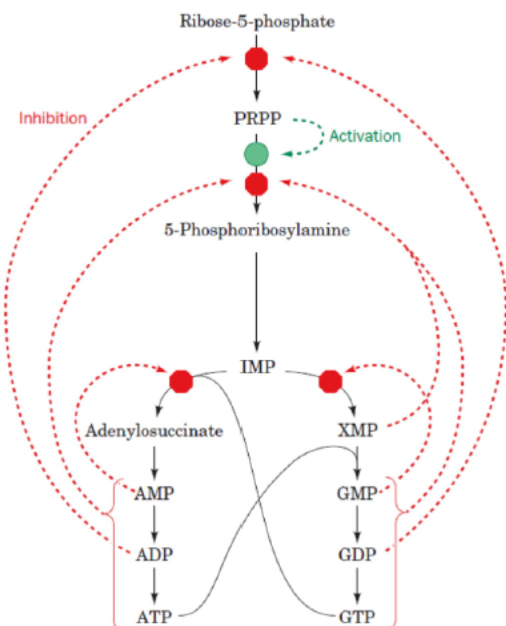
כדי לסנתז נוקלאוטיד צריך תחילה את הסוכר- הריבוז. הוא יעבור פוספורילציה לריבוז-5-פוספט. עליהם נלביש את הבסיסים החנקניים. המקור ליצירתם הוא חומצות אמינו (גלוטמין, אספרטט וגליצין). התהליך של הוספת הבסיס דורש ATP.

הנוקלאוטידים יכולים להתפרק שוב למרכיביהם. הסוכר יופרד מהטבעת החנקנית, ויהיה בצורה של ריבוז-1-פוספט. התוצר השני הוא תלוי בזהות הנוקלאוטיד. פורינים נשברים לחומצה אורית (בכמה ריאקציות), שצריכה להיות מפורקת או מופרשת בשתן (אצל בני אדם, קופים, ציפורים וזוחלים הוא מופרש בשתן; אצל יונקים אחרים הוא מפורק).לא צריך להכיר את השמות של האנזימים בקטבוליזם של פורינים. שגדון (דלקות פרקים) נגרם מהצטברות של חומצה אורית.

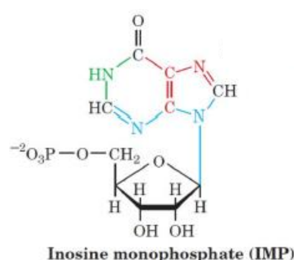
פירמידינים הופכים לנגזרת של קו-A (הולכים לקטבוליזם).

סינתזה של פורינים :

התהליך מתחיל מריבוז-5-פוספט. הוא יעבור סדרת ריאקציות (של 11 תגובות) שבסיומן יהיה IMP (inosine mono phosphate). ה-IMP יומר ל-GTP או ATP בריאקציות שונות, שמבקרות אחת את השנייה.



נסקור ארבע מתוך 11 הריאקציות הללו : ריבוז-5-פוספט הופך ל-PRPP. זה אותו הריבוז אבל עם עוד 2 פוספטים. לאחר מכן יוסרו שני פוספטים ויתווסף אמין, והוא יהפוך ל-PRA. על הבסיס הזה תבנה הטבעת החנקנית, ונקבל IMP, שזה כבר ריבוז עם טבעת חנקנית. הטבעת החנקנית מכילה מרכיבים של החומצות אמינו שהזכרנו. רכיבי חומצות האמינו יולבשו בהדרגה על האמין, בסדרה של ריאקציות. כל צבע באיור של IMP מייצג אטומים שהגיעו מחומצות אמינו אחרות. מה שתיארנו זה תהליך חלקי, יש עוד שלבי ביניים בדרך. זה תהליך מאוד שמור באבולוציה.

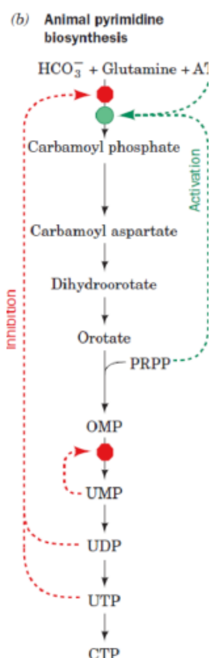


ביצור פורין דה-נובו לא קיים באף שלב פורין חופשי (אדנין, גואנין). כאמור, הוא מסונתז על הריבוז בכמה שלבים. ישנה אפשרות לא להרכיב את הטבעת בשלבים רבים, אלא לקחת פורין שלם מהמזון, ואותו להרכיב על ה-PRPP כדי ליצור נוקלאוטיד. זה נקרא purine salvage. זה תהליך לא שמור באבולוציה.

האנזים שאחראי על ההדבקה של אדנין ל-PRPP נקרא APRT. הוא יוצר AMP .

האנזים שאחראי על ההדבקה של גואנין ל-PRPP נקרא HGPRT. הוא יוצר GMP ו-IMP. חוסר באנזים זה גורם לשגדון, כי הוא מוביל להצטברות של חומצה אורית (ההצטברות של החומצה אורית היא כתוצאה מפורין חופשי מהמזון, שלא נוצל ל-salvage והתפרק).

סינתזה של פירמידינים :

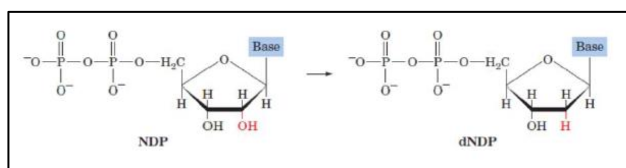


בשונה מפורינים, שם מסנתזים את הטבעת החנקנית על הריבוז, טבעות הפירמידין בשלמותן נוצרות לפני הצימוד לריבוז. תחילה מיוצר UMP (אורציל) ב-6 ריאקציות, והוא הופך אח״כ ל-CMP (ציטוזין). תימין זה סיפור אחר- לא נכנס אליו. לאחר שהטבעת מוכנה, היא מודבקת ל-PRPP. תהליך של pyrimidine salvage הוא לא נפוץ, לא ממש רואים פירמידינים חופשיים.

לסינתזה של טבעת פירמידינים צריך אספרטט וגלטומין. זה תהליך פחות שמור באבולוציה מסינתזה של פורינים. מנצלים את העובדה הזו לסינתזה של אנטיביוטיקות.

סינתזה של דה-אוקסי-ריבונוקלאוטידים :

התהליך שפורט קודם היה יצור של ריבונוקלאוטידים. דה-אוקסי-ריבונוקלאוטידים נוצרים מהנוקלאוטידים המקבילים אליהם ע״י אנזימים מיוחדים שנקראים **ריבונוקלאוטיד רדוקטזות**, הם מורידים מהריבונוקלאוטיד קבוצת קרבוקסיל. דוגמא- AMP הופך ל-dAMP.



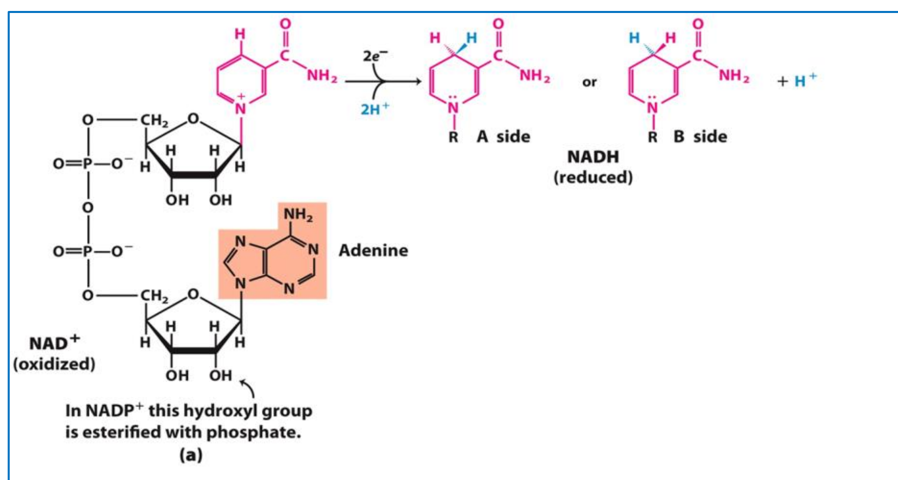
ליפידים

<u>מעגל הפנטוז-פוספט</u>

לכל התהליכים המטבולים שראינו עד כה הייתה תכלית אחת-להפיק אנרגיה. מעגל הפנטוז-פוספט לא מייצר ולא צורך ATP. מטרתו היא לייצר שני תוצרים חשובים- סוכרים של 5 פחמנים (פנטוזות), החשובים לבניית ה-DNA וה-RNA ; ו-NADPH (מולי מזורחנות שנושאת אלקטרונים) שישמשו את הגוף לסינתזה של סוכרים, שומנים, כולסטרול ונוקלאוטידים, וגם ישמשו כנוגדי חמצון.

נשא האלקטרונים העיקרי ששימש עד כה הוא NADH. במיטוכונדריה, הוא עבר חמצון בשרשרת הנשימה כדי לייצר ATP. בצורתו המזורחנת הוא NADPH. ה-NADPH היא המולי הנחוצה לסינתזה. תהליכי הביוסינתזה מתרחשים בציטופלסמה.

טבעת הניקוטין- NAD^+ (או $NADP^+$ עם זרחן), היא בעלת חנקן חיובי, אבל המולקולה עצמה היא שלילית. לאחר חיזור אותו החנקן מקבל שני אלקטרונים. ההבדל בין ה- NAD^+ ל-$NADP^+$ הוא בזרחון של קבוצת ההידרוקסיל שעל הפחמן בריבוז (למטה).



בגוף, אלו היחסים בין הצורות המחומצנות והמחוזרות של שתי המולקולות :

$NAD^+/NADH \approx 1{,}000$

$NADP^+/NADPH \approx 0.1$

מכאן, ש-NAD^+ יהיה יותר בצורה המחומצנת, וה-NADPH יהיה יותר בצורה המחוזרת.

NADP+/NADPH היא מולקולה חיונית לנטרול רדיקלים חופשיים. כל מולקולה שעוברת חמצון יכולה ליצור ROS (reactive oxygen species)- חמצן רדיקל. זו מולקולה מאוד לא יציבה, ותוך כמה מילישניות החמצן הרדיקלי "יגנוב" אלקטרונים ממולקולות אחרות כמו חלבונים, שומנים, DNA. המולקולה שממנה נחטף האלקטרון תעבור נזק. אם זה ב-DNA נראה מוטציות, אם זה בחלבון או חומצת שומן, זה נזק למולי. רדיקלים חופשיים במידת מה כן חשובים בגוף, כי הם משמשים כמתווכים בכמה מנגנונים של העברת אותות. אבל הצד השלילי שלהם הוא נזק למולקולות אחרות. ככל שיהיה יותר חמצן ויותר נשימה תאית, יהיה יותר סטרס חמצוני ויותר נזק.

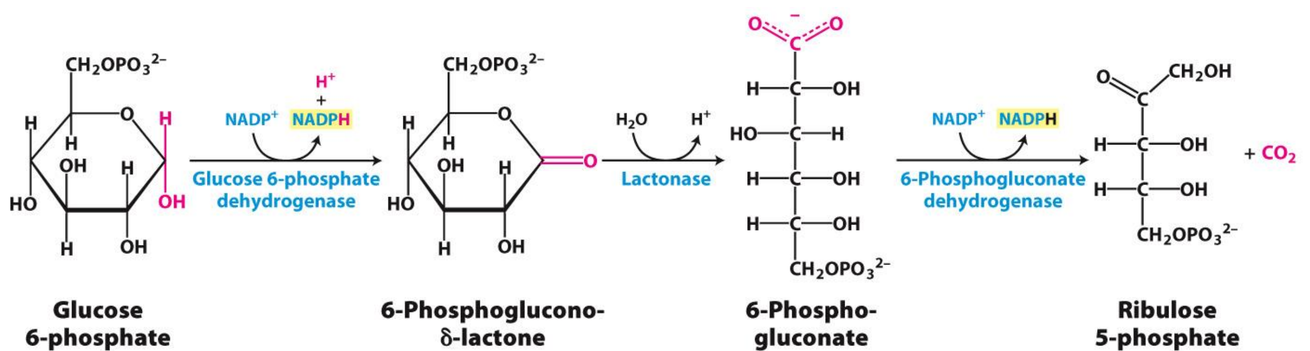
גליקוליזה מתחילה ביצירה של גלוקוז-6-פוספט. זה השלב מגביל הקצב בגליקוליזה. ה-G6P יכול להמשיך בגליקוליזה לפירובט, ויכול להמשיך למסלול אחר של הפנטוז-פוספט (PPP). אפשר לחלק אותו לשתי ריאקציות : השלב החמצוני והשלב הלא חמצוני. מעגל הפנטוז-פוספט לא מתרחש בכל רקמה, אלא ברקמה שבה צריך ריבוזים או NADPH. הצורך בהם מתעורר כאשר התא צריך שומנים, או כאשר תא צריך להתחלק (ואז הוא צריך ריבוזים). רקמות בהן יש צורך בסנתוז שומן הן בעיקר הכבד ורקמת השומן, אבל זה יתכן גם ברקמות נוספות כמו השחלות או האדרנל, ושאר בלוטות שמייצרות הורמונים סטרואידים. מעגל זה לא מתקיים בשריר.

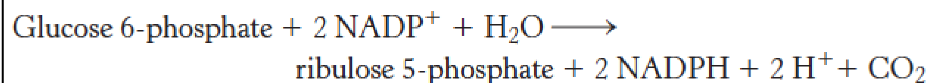
השלב החמצוני של הפנטוז-פוספט:

בשלב הזה נוצר ה-NADPH. יש שלושה שלבים בתהליך:

1. גלוקוז-6-פוספט הופך ל-6 פוספוגלוקו-דלתא-לקטון, בעזרת האנזים גלוקוז-6- פוספט דה הידרוגנז **(G6PD)**, ונוצר NADPH.
2. אנזים לאקטונאז עושה לו הידרוליזה והופך אותו ל-6-פוספו-גלוקונאט. הטבעת נפתחה.
3. אנזים 6-פוספוגלוקונאט דה הידרוגנז עושה דה-קרבוקסילציה ונוצר ריבולוז-5- פוספט. בשלב הזה זה אובד פחמן אחד (משתחרר פד״ח), ונוצר עוד NADPH.

כל השלבים האלו אינם הפיכים. השלב הראשון עם G6PD הוא שלב מגביל קצב. G6PD יכול להשתמש גם ב-NAD^+, אבל הוא יעדיף את ה-$NADP^+$ (אפיניות גבוהה פי 1000 ל-$NADP^+$ בהשוואה ל-NAD^+).

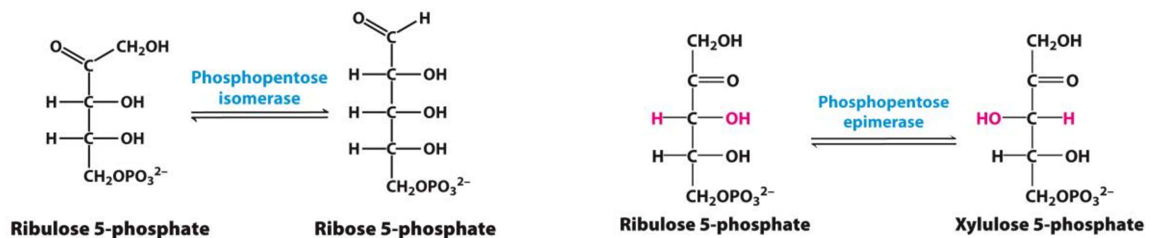




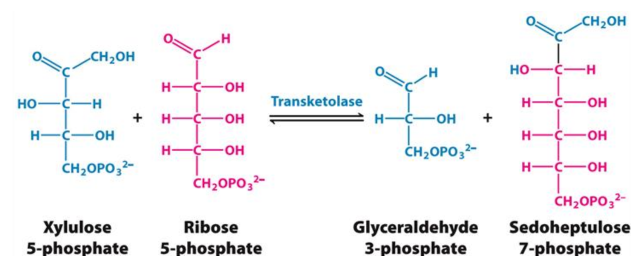
$$\text{Glucose 6-phosphate} + 2\,NADP^+ + H_2O \longrightarrow \text{ribulose 5-phosphate} + 2\,NADPH + 2\,H^+ + CO_2$$

השלב הלא חמצוני:

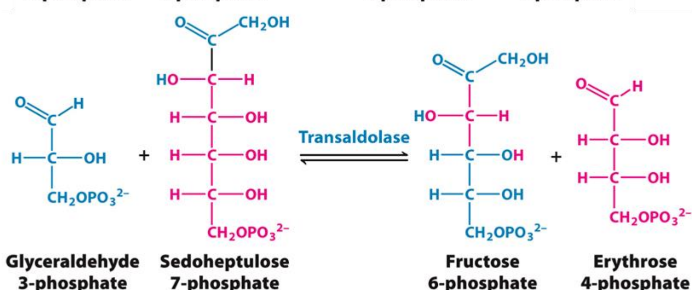
הריבולוז-5-פוספט הוא קטוז, והוא מהווה סובסטרט לשני אנזימים: (א) אנזים איזומרז, שהופך אותו לאלדוז: ריבוז-5-פוספט. (ב) אנזים אפימרז, שמשנה את האיזומרציה שלו ומתקבל קסילולוז-5-פוספט.



לאחר מכן תהיה סדרה של שלוש ריאקציות שבה יווצרו סוכרים שונים, בעלי כמות פחמנים שונה (מ-3 ועד 7).

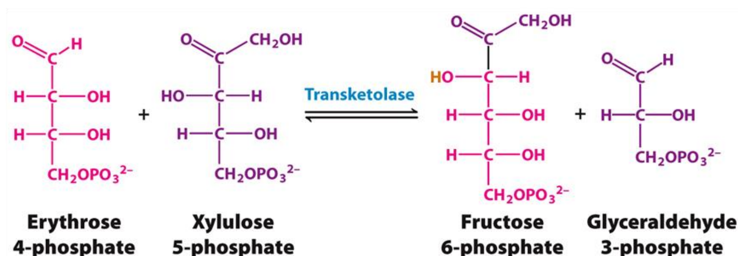


1. הקסילולוז והריבוז-5-פוספט, בנוכחות ויטמין B1 הופכים לגליצרל אלדהיד-3-פוספט (G3P) וסדוהפטולוז-7-פוספט. ה-G3P הוא אחד מתוצרי הגליקוליזה.
האנזים הוא טרנסלוקז.

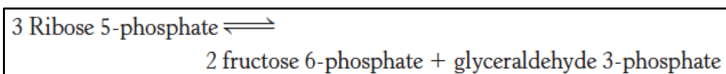


2. שני חומרים אלו מגיבים בעצמן, והופכים לפרוקטוז-6-פוספט (שוב תוצר מגליקוליזה) ואריתרוז-4-פוספט.
האנזים הוא טרנסאלדולז.

3. אריתרוז-4-פוספט וקסילולוז-5-פוספט הופכים לפרוקטוז-6-פוספט וגליצרל אלדהיד-3-פוספט. האנזים הוא טרנסקטולאז.



אפשר להסתכל על התגובה נטו. סה״כ על שלוש מולקולות ריבוז-5-פוספט, נוצרות שתי מולקולות F6P ומולקולת G3P אחת.


3 Ribose 5-phosphate $\rightleftharpoons$ 2 fructose 6-phosphate + glyceraldehyde 3-phosphate

כל הריאקציות בשלב זה הן הפיכות ולא דורשות אנרגיה. משום כך, אנשים שחסר להם האנזים G6PD, עדיין יכולים לייצר ריבוזים לנוקלאוטידים- הם ישתמשו בתוצרי הגליקוליזה- פרוקטוז-6-פוספט וגליצראלהיד-3-פוספט, לייצר את הריבוז בריאקציות ההפוכות, תוך דילוג על השלב החמצוני.

<u>בקרה על ה-PPP</u>

אנזימים רבים עוברים רגולציה על ידי התוצר. האנזים החשוב ביותר הוא ה-G6PD, והוא מעוכב בצורה החזקה ביותר על ידי $NADP^+$/NADPH, שקשורים במצב החמצון-חיזור בתא. כאשר $NADP^+$ בריכוז גבוה (משמע NADPH הוא בריכוז נמוך), הוא מזרז את האנזים, ולהיפך- NADPH גבוה מעכב את האנזים. $NADP^+$ ו-NADPH מתחרים על הקישור לאנזים.
בתאי כבד, בהם המסלול ה-PPP הוא הכי נפוץ, היחס הוא בדר״כ לטובת ה-NADPH, ולכן המסלול בדר״כ מעוכב.

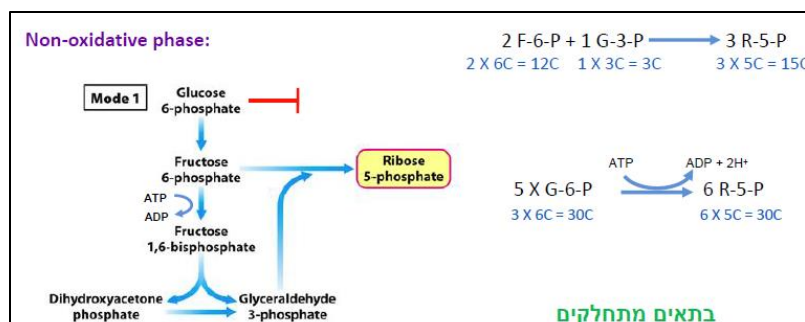
כל שאר השלבים החמצוניים, והשלבים הלא חמצוניים מבוקרים על ידי ריכוז הסובסטרט.

<u>ניתוב הגלוקוז-6-פוספט</u>

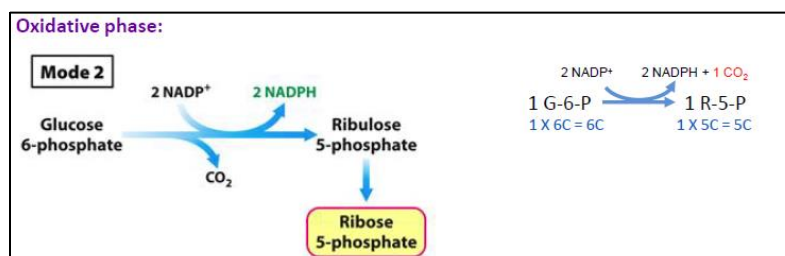
ברמת העקרון, כאשר התא זקוק להרבה ATP, ה-G6P יופנה לגליקוליזה, וכאשר התא זקוק להרבה NADPH ה-G6P יופנה למסלול הפנטוז-פוספט. אבל המצב יותר מורכב מזה.

נתאר 4 תרחישים:

1. תאים מתחלקים. תאים אלו צריכים לייצר הרבה DNA. לכן, התא זקוק להרבה ריבוז-5-פוספט, וגם ל-NADPH, אבל באופן פחות קריטי. במקרה זה התא ידלג על השלב החמצוני. תתרחש גליקוליזה, וחלק מתוצריה ינותבו לשלב הלא חמצוני בכיוון ההפוך: 2 מולקולות של F6P יגיבו עם מולקולת G3P, ונקבל 3 מולקולות של ריבוז-5-פוספט.



2. צרכי האנרגיה של התא מאוזנים (אין צורך בהרבה ATP ו-NADH), והוא צריך ריבוז ו-NADPH באופן מאוזן-לסינתזה. כעת יתרחש רק השלב החמצוני: גלוקוז-6-פוספט יעבור חמצון ונרוויח 2 NADPH וריבוז-5-פוספט אחד.



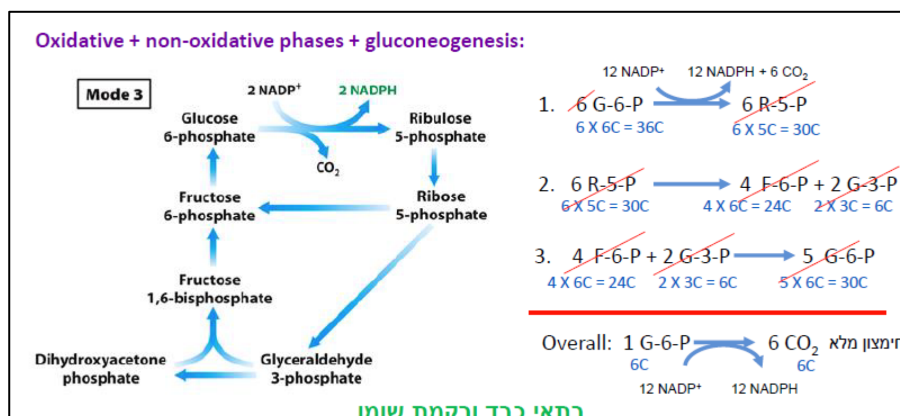
3. התא לא מאוזן- צריך הרבה יותר NADPH מאשר ריבוזים. תאי כבד ושומן עסוקים רוב הזמן בייצור חומצות שומן, ולכן זה יאפיין אותם. במקרה זה התא משלב כמה תהליכים יחד:

(א) ה-G6P הולך לשלב החמצוני- נוצר ריבולוז-5-פוספט. נוצרות שתי מולקולות NADPH.

(ב) הריבולוז לא נחוץ, לכן הוא יעבור את השלב הלא חמצוני- יווצר F6P ו-G3P.

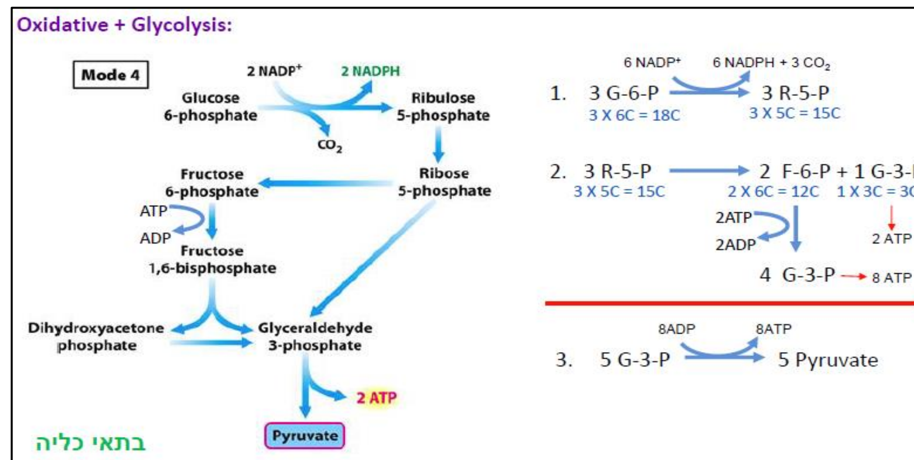
(ג) מולקולות אלו יכולות לעבור גלוקוניאוגינזה חזרה ל-G6P, שיכול לייצר עוד NADPH.

אם עושים את זה 6 פעמים, אפשר לקבל שריפה מלאה של הגלוקוז-6-פוספט (בכל סבב חמצוני ישרף פחמן 1). בנטו, גלוקוז-6-פוספט עובר שריפה מלאה ל-6 מולקולות של CO_2, ונוצרות 12 מולקולות של NADPH.



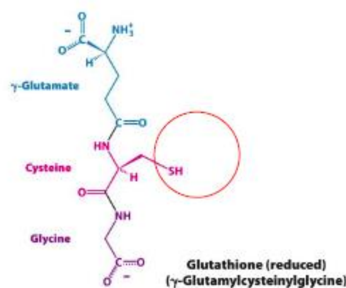
4. התא זקוק גם ל-ATP וגם ל-NADPH. המעגל פנטוז-פוספט לא יסגר. G6P ילך כולו למסלול החמצוני (לא יכנס לגליקוליזה), וימשיך גם השלב הלא חמצוני. נקבל את הפרוקטוז-6-פוספט, אשר יעבור את המשך הגליקוליזה, ועוד G3P שיכול גם להמשיך בגליקוליזה. בעצם עשינו מעקף לשלב אחד של הגליקוליזה (הפיכת G6P ל-F6P), בדרך נוצרו 2 מולקולות של NADPH. עם זאת, בגלל שבמסלול ה-PPP נשרף פחמן אחד של ה-G6P, הפסדנו פירובט אחד על 3 מולי G6P.

אם מסתכלים על התהליך נטו, מ-3 מולקולות G6P אפשר להרוויח 6 מולי NADPH, 5 פירובטים, ו-8 מולקולות ATP (זה 8 ולא 10 כי 2ATP מתבזבזים בהפיכת 2F6P ל-2F16BP). והפירובטים בעצמם יכולים להמשיך ולייצר עוד ATP במיטוכונדריה.



מערכת הגלוטטיון

אנטי-אוקסידנטים נועדו להתמודד עם הרדיקלים החופשיים שנוצרו במהלך הנשימה. לתא יש שלוש מערכות עיקריות אנטי-אוקסידנטיות להתמודד עם רדיקלים: יש אנזימים (המפרקים אותם למים), ויטמינים, ומערכת הגלוטטיון.



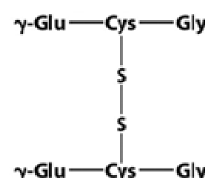
גלוטטיון זה רצף של 3 חומצות אמינו: גלוטמט, ציסטאין וגליצין. לפטטיד הזה יש קבוצה אחת של SH, שיכולה להגיב עם ה-ROS. הרבה מה-ROS הם פרוקסידים (תרכובות עם O-O, כמו מי חמצן).

הגלוטטיון מונע את הנזק החמצוני בעזרת שני אנזימים:

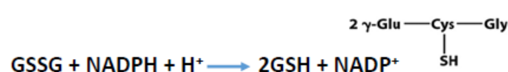
-גלוטטיון פראוקסידאז, שמגיב את הגלוטטיון המחוזר (GSH) עם הרדיקל, ונוצר מים, אלכוהול, וגלוטטיון מחומצן (GSSG). אלכוהול ומים הם פחות מזיקים מרדיקלים.



שני גלוטטיון מחומצנים יקשרו בקשר די-סולפידי:



-הגוף צריך למחזר את הגלוטטיון למצב מחוזר, שימשיך להתמודד עם עוד רדיקלים. לכן קיים אנזים הופכי- גלוטטיון רדוקטז, שהופך את הגלוטטיון המחומצן חזרה ל-2 מולקולות גלוטטיון מחוזר, תוך ניצול NADPH.



עקה חמצונית (oxidative stress) מוגדרת כאשר יש יותר גלוטטין מחומצן מאשר מחוזר. חסר של גלוטטיון בכבד גורם למוות.

G6PD deficiency

בעת ההתמודדות עם הרדיקלים נוצלה מולקולה NADPH. כדי שה-NADPH יווצר צריך את השלב החמצוני של פנטוז-פוספט. אנשים עם מוטציה באנזים ה-G6PD מייצרים מעט מהאנזים הזה, ומה שהם מייצרים נותן פעילות נמוכה (יש ירידה של 95% בפעילות האנזים). לכן אצלם יש ירידה בפעילות של הגלוטטיון רדוקטז, והם בעלי יכולת פחותה לפרק פראוקסידים. זו מחלה בתאחיזה ל-X (לכן תופיע יותר אצל גברים), והיא נפוצה באזור המזרח התיכון ואפריקה. יש למחלה כ-400 וריאנטים.

הנזק בא לידי ביטוי הכי הרבה בכדוריות הדם האדומות. תאים אלו חסרי גרעין ומיטוכונדריה, אין להם אפשרות לייצר מחזר אחר במקום ה-NADPH (למשל אנזים מאליק), ולכן הם תלויים לחלוטין בגלוטטיון כדי להתמודד עם רדיקלים. הגלוטטיון שומר על החלבונים במצב מחוזר, ולכן הוא שומר על המבנה שלהם. בהעדר גלוטטיון, המוגלובין מאבד את המבנה שלו. כתוצאה מכך, כדורית הדם האדומה תיצור אגרגטים בשם Heinz bodies. הטחול הוא בית חרושת לחיסול כדוריות דם אדומות. הוא מזהה את הכדוריות עם האגרגטים כלא תקינות והורס אותן. זה מוביל לצהבת והמוליזה.

לרוב האנשים עם G6PD deficiency, בתנאים נורמלים, הפעילות הפחותה של האנזים מספיקה כדי לשמור על הגלוטטין המחוזר ברמה תקינה. הם לא יבטאו תסמינים בתנאים אלו. הם יתחילו לבטא תסמינים אם יגיע טריגר, שיעלה את כמות הנזק החמצוני, ואז לא יהיה מספיק גלוטטיון מחוזר שידע להתמודד עם המצב. זה קורה עקב חשיפה לתרופות (תרופות למלריה, חלק מהאנטיביוטיקות, אספרין), קטניות (בעיקר פול). לאדם רגיל, אותם אוקסידנטים לא יובילו לשום נזק, מערכת הגלוטטיון תדע להתמודד. אצל חסרי G6PD, התסמינים יהיו תלויים במידת הפעילות שנותרה לאנזים, במידת הנזק החימצוני שקיים בגוף, ובמידת הפגיעה בהמוגלובין.
בילירובין הוא תוצר פירוק של המוגלובין, וכמות הבילירובין בדם הוא אינדיקציה למידת הפגיעה בהמוגלובין. רמותיו יהיו גבוהות בסרום במידה ויש פגיעה בהמוגלובין. הבילירובין מופרש גם בשתן, ולכן אם תהיה פגיעה בהמוגלובין השתן יהיה שחור, ולכדוריות הדם יהיו את המבנה האופייני לגופיפי היינץ.

טיפול בחסר ב-G6PD: דיאטה נכונה- מניעה מאכילת מאכלים אוקסידנטים כמו פול, או צריכת תרופות אוקסידנטיות כמו אספירין. בעת התקף אקוטי נותנים עירוי דם. אם היה נזק כלייתי נטפל בדיאליזה.

בדומה לאנמיה חרמשית הקשורה בכדוריות הדם האדומות, מוצאים כי התפוצה של G6PD היא בהתאמה לתפוצה של מלריה. נגיף המלריה זקוק ל-NADPH כדי להדביק את המאחסן. לכן חולי G6PD לא יכולים להדבק במלריה, ויש להם יתרון אבולציוני באותם אזורים גיאוגרפים שהמחלה נפוצה.

ליפידים

העולם החי בנוי ממולקולות אורגניות מבוססות פחמן, מימן וחמצן. יש גם מעט פוספט, וחנקן, וקצת מתכות.

שומנים הם מולקולות ארוכות של פחמנים. הם חלק מאבני הבניין של הגוף. בתא, מרבית השומנים נמצאים בממברנות-הפלסמטית ואלו של האברונים.

Lipidome- מתייחס לכל מולקולות הליפידים בתא. מולקולות שומנים בהגדרתן בלתי מסיסות במים וכן מסיסות בחומרים אורגנים. ליפידים זו משפחה גדולה של חומרים הכוללת:

- חומצות שומן. היא אבן הבניין של כל השומנים.
- פוספוליפידים.

- גליקוליפידים.
- סטרולים (כולסטרול הוא הנציג העיקרי).
- טריגליצרידים.

תפקידים שונים של ליפידים :

- מרכיבים עיקריים של ממברנות. בעיקר פוספוליפידים וספינגוליפידים.
- מאגרי אנרגיה עיקריים. אלו הם הטריגליצרידים.
- מעבר אותות.
- קו-פקטורים לאנזימים.
- ויטמינים.
- הורמונים.
- פיגמנטים.
- מלחי מרה.

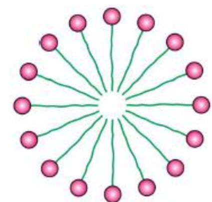
נתמקד בשניים הראשונים.

ממברנות :

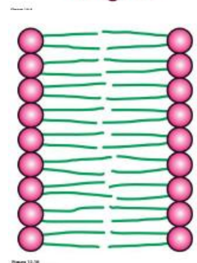
החשיבות העיקרית של ממברנות היא שמירה על הומאוסטזיס. הן שומרות על מדורים שונים עם סביבות שונות, מה שמאפשר את קיום רוב התהליכים. מצידי הממברנות קיים גרדיאנט של ריכוזים ומתחים, שמאפשר לתא להפיק אנרגיה ולקיים תהליכים שונים נוספים.

יש בעייה עקרונית עם ממברנות וליפידים בכלל- הסביבה של הגוף היא מימית, ושומנים הם הידרופוביים. עובדה זו היא מהותית במבנה של הממברנה, והיא יוצרת את הסלקטיביות שלה. שטח ממברנה הוא עצום, בצורה של יריעה. הממברנות הן bilayer. השכבה שפונה לצד הציטוזול שונה מהשכבה הפונה אל תוך האברון/אל חוץ תא ועל כן ממברנות הן לא סימטריות. הן מורכבות מכמה סוגי ליפידים, חלבונים ופחמימות. יש להן יכולות להיות אמפיפטיות- גם הידרופיליות וגם הידרופוביות.

ממברנות במים :



לחומצות שומן יש ראש פולרי וזנב הידרופובי. כאשר הם יהיו בסביבה מימית, הם יסתדרו בצורה כדורית הנקראת מיצלה. החלק הפנימי של המיצלה הוא החלק ההידרופובי, והחלק החיצוני של המיצלה הוא החלק הפולרי. זה מבנה לא יציב, ולכן הוא יהיה קטן- טיפות בגודל של עד 20 מ״מ בקוטר. סבון למשל יוצר מבנה של מיצלה סביב טיפת שומן שלא נשטפה במים.



לפוספוליפידים יש שני זנבות של חומצות שומן, ולכן הם יכולות ליצור מבנה אחר של bilayer. זה מבנה הרבה יותר יציב, והוא לא מוגבל בגודל שלו (יותר מ-1 מ״מ). זה מבנה שעובר הרכבה עצמית באופן ספונטני, בכוח ההנעה של הכוחות ההידרופובים. המבנה הדו שכבתי יסגר, וכך נקבל אברון/תא מוקף ממברנה. המבנה יהיה ללא חורים, ותהיה לו חדירות נמוכה ליונים, למולקולות פולריות ולחלבונים.

ממברנה לא מונעת לחלוטין את המעבר של מולקולות. יש לה חדירות סלקטיבית. יכולה להתרחש דיפוזיה פסיבית דרך ממברנה, כתלות במטען ובגודל של המולקולה. באופן כללי, מולקולות טעונות או גדולות לא חודרות את הממברנות. לכן יונים, גלוקוז וחומצות אמינו לא חודרים. מולקולות קטנות שאינן פולריות יכולות במידה מסוימת לחדור את הממברנה. זה כולל גזים (חמצן, פד״ח, חנקן), גליצרול ואתנול.

כל אותן מולקולות שלא יכולות לחדור את הממברנה אבל צריכות להיות בתוך התא יעזרו בחלבונים נשאים או בתעלות כדי להכנס. מים חודרים את הממברנה גם בדיפוזיה (הן מולקולות קטנות ולא טעונות, שנמצאות בריכוז מאוד גבוה, לכן יכולות לחצות) ובזכות אקווה-פורינים, תעלות מיוחדות למים.

ממברנה מורכבת גם מחלבונים. חלבוני הממברנה יכולים להיות רצפטורים, תעלות, טרנספורטרים ועוד. הם חלק אינטגרלי של הממברנה. הם מעוגנים בצורות שונות בממברנות, ויכולים לעבור גליקוזילציות.

<u>חומצות שומן</u>

חומצות שומן יכולות להיות באורך שונה. הקטנה ביותר היא של ארבעה פחמנים (די נדיר בתא). רוב השומנים בתא הן של 16-24 פחמנים, במספרים זוגיים. חומצות שומן תמיד מסתיימות בחומצה קרבוקסילית, וב-pH של התא הן בצורה יונית-COO^-.

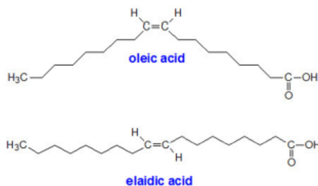
חומצות שומן יכולות להיות רוויות במימנים (דהיינו אין קשרים כפולים), נקראות **SFA**-saturated fatty acid, או לא רוויות (עם קשרים כפולים). בקשר יחיד בין שני פחמנים, יש סיבוב חופשי סביב הקשר. בקשר כפול, אין אפשרות לסיבוב סביב הקשר. ככל שיש יותר קשרים כפולים, חומצת השומן מאבדת עוד מדרגות החופש של הסיבוב.

בחומצות שומן לא רוויות מבחינים בין :

-חד לא רוויות- הן בעלות קשר כפול אחד. נקראות **MUFA**-mono-unsaturated fatty acid.

-רב-לא רוויות-עם כמה קשרים כפולים. נקראות **PUFA**-poly-unsaturated fatty acid.

אף פעם לא יהיו שני קשרים כפולים סמוכים, תמיד יפריד ביניהם קשר בודד. בדר"כ קשרים כפולים מתחילים בפחמן 9. בגוף, כל הקשרים הכפולים הם בציס. בתעשייה מוצאים גם פחמנים בטרנס.



קשר כפול בקונפיגורציה ציס יוצר כיפוף בזנב חומצת השומן. קשר כפול בטרנס ישאיר אותה בשרשרת ישירה. בממברנות, קשרים מסוג ציס יגבירו את הפלואידיות משום שיש יותר מרווח בין הליפידים שבונים את הממברנה. העלאת השכיחות של חומצות שומן טרנס בממברנה מעלה את הסיכון למחלות לבביות.

חומצות השומן הן אבני הבניין של כל שאר הליפידים.

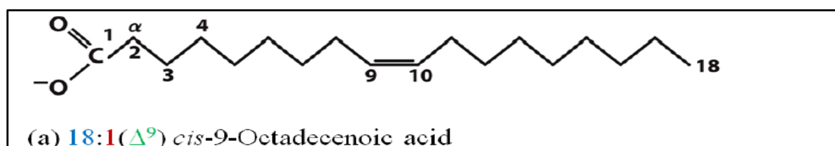
נומקלטורה של חומצות שומן :

יש כמה שיטות לנומקלטורה. הראשונה היא ***השיטה הסיסטמית***.

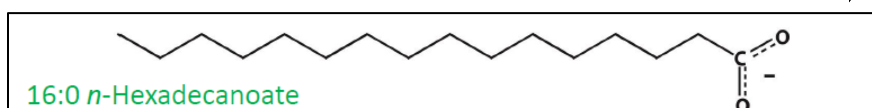
נתונה דוגמא של חומצת שומן עם 18 פחמנים. הספירה של הפחמנים מתחילה בקצה הקרבוקסילי. הפחמן הקרבוקסילי הוא פחמן מספר 1. הפחמן השני קרוי גם אלפא, השלישי ביתא.. וכו'. הפחמן האחרון, שעליו יש קבוצת מתיל, הוא אומגה.

מספר הפחמנים של חומצת השומן מצוין בשיטה הסיסטמית גם בהתחלה וגם בסוף- שמה יתחיל ב-18 ומסתיים גם בציון של מספר הפחמנים- octadecenoic מציין 18.

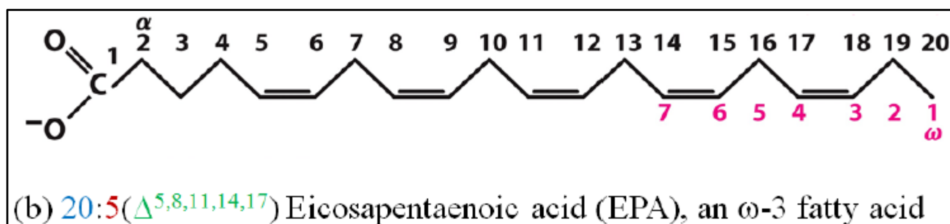
אם יש קשר כפול, הוא יצויין מיד אחרי מספר הפחמנים. יהיה כתוב כמה קשרים יש, ואת המיקום שלהם- (Δ^9)1, ואת הקונפיגורציה-ציס.



אם אין קשרים כפולים, במקום המספר של הקשרים הכפולים יופיע n:0.



בספירה האלטרנטיבית מתחילים את הספירה מהאומגה. חומצת שומן אומגה 3 תציין שיש קשר כפול בפחמן מספר שלוש כאשר מתחילים לספור מהאומגה. בדוגמא פה נתון השם לפי השיטה הסיסטמית והשיטה האלטרנטיבית.



(b) 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) Eicosapentaenoic acid (EPA), an ω-3 fatty acid

הסיומת של השם משתנה לפי שני גורמים:

א. האם החומצת שומן במצב יוני או לא. כאשר היא במצב יוני, כמו ב-pH הפיסיולוגי, הסיומת היא **ate**. כאשר היא במצב לא מיונן הסיומת היא **ic acid**. דוגמא- ח. שומן של 18 פחמנים תקרא plamitate במצב מיונן ו-palmitic acid במצב לא מיונן.

ב. מספר הקשרים הכפולים. כשאין קשר כפול, הסיומת תהיה **anoic**. כשיש קשר כפול אחד, השם יסתיים ב-**enoic**. כאשר יש שני או שלושה קשרים כפולים, השם יסתיים ב-**dienoic**, ו-**trienoic**, בהתאמה.

מעבר לשמות הרשמים, לכל מיני חומצות שומן נפוצות יש גם שמות אחרים. דוגמאות בטבלה.

צריך לזכור את השמות שמופיעים בטבלה הזו.

לכל מיני חומצות יש פיזור שונה. למשל, חומצה myristic (14 פחמנים, לא רוויה), משמשת למודיפיקציה פוסט תרגומית של חלבונים רבים. היא תהיה מאוד נפוצה.

חומצה palmitic (16, פחמנים, לא רוויה), היא חומצת השומן הנפוצה ביותר בצמחים, בחיות ובמיקרואורגניזמים.

לעומת זאת, חומצת stearic (18 פחמנים, לא רוויה), כמעט ולא נפוצה בצמחים. היא חשובה בפטריות וחלק מהחיות.

Carbon skeleton	Structure*	Systematic name†	Common name (derivation)
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	*n*-Dodecanoic acid	Lauric acid (Latin *laurus*, "laurel plant")
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	*n*-Tetradecanoic acid	Myristic acid (Latin *Myristica*, nutmeg genus)
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	*n*-Hexadecanoic acid	Palmitic acid (Latin *palma*, "palm tree")
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	*n*-Octadecanoic acid	Stearic acid (Greek *stear*, "hard fat")
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	*n*-Eicosanoic acid	Arachidic acid (Latin *Arachis*, legume genus)
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	*n*-Tetracosanoic acid	Lignoceric acid (Latin *lignum*, "wood" + *cera*, "wax")
16:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	*cis*-9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid
18:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	*cis*-9-Octadecenoic acid	Oleic acid (Latin *oleum*, "oil")
18:2($\Delta^{9,12}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	*cis*-,*cis*-9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid (Greek *linon*, "flax")
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	*cis*-,*cis*-,*cis*-9,12,15-Octadecatrienoic acid	α-Linolenic acid
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	*cis*-,*cis*-,*cis*-,*cis*-5,8,11,14-Icosatetraenoic acid	Arachidonic acid

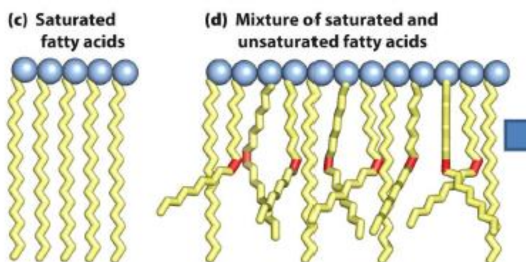
תכונות פיסיקליות של חומצות שומן:

המסיסות של חומצת השומן במים **וטמפ' ההתכה** תלויות בשני גורמים:

א. אורך חומצת השומן. ככל שהיא ארוכה יותר היא מסיסה פחות, וטמפ' ההתכה עולה.

ב. מספר הקשרים הכפולים. ככל שיש בה יותר קשרים כפולים היא מסיסה יותר, וטמפ' ההתכה יורדת.

למשל, חומצה בעלת 18 פחמנים בצורה הרוויה היא בעלת טמפ' התכה של 70 מעלות בערך. לעומת זאת, אותה חומצה עם קשר כפול אחד היא בעלת טמפ' התכה של כ-14 מעלות. טמפ' הרתיחה תקבע את המיקום של חומצת השומן בתא.



כאשר יש הרבה חומצות שומן רוויות אחד ליד השנייה, הם יצרו אינטראקציות הידרופוביות ביניהן. אותן אינטראקציות מאוד מייצבות את המבנה, ויוצרות מוצק. כך זה בשעווה. כאשר יש הרבה חומצות שומן לא רוויות, הן פחות צמודות אחת לשנייה, וקשה להן יותר ליצור אינטראקציות הידרופוביות. לכן טמפ' ההתכה שלהן נמוכה יותר, והן נוזליות יותר.

ככל שהשרשרת יותר קצרה ועם יותר קשרים כפולים, כך היא יותר נוזלית.

<u>מרכיבים ליפידים של ממברנות</u>

יש הרבה מאוד סוגים של ליפידים בממברנות. הנפוצים ביותר הם הפוספוליפידים. בנוסף יש גם גליקוליפידים וכולסטרול.

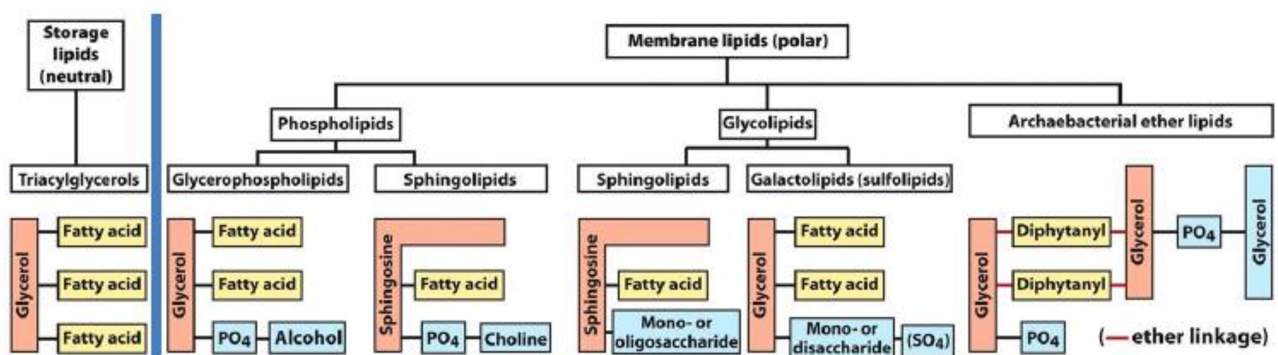
סיווג של ליפידים:

לכל הליפידים יש שלד- **גליצרול** או **ספינגוזין**. השלד יכול לייצר קשרים עם חומצות שומן או חלק פולרי.

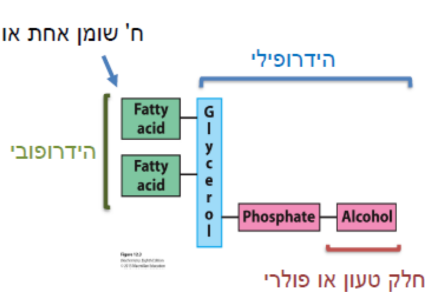
טריגליצרידים- משמשים יותר לאחסון. אינם פולרים. הגלירצרול קשור ל-3 חומצות שומן.

הפוספוליפידים והגליקוליפידים- משמשים יותר לבניית הממברנה. השלד קשור לחומצת שומן אחת או שתיים, ובנוסף קשור לרכיב פולרי.

קיימים עוד סוגים של ליפידים ממברנלים פולרים, שנפוצים בארכיאות.

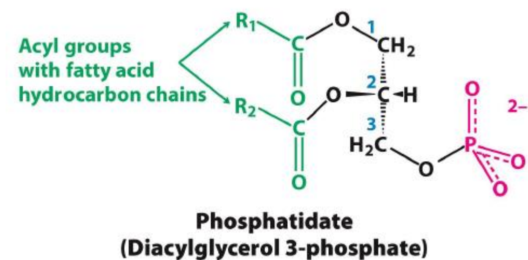


פוספוליפידים: מתחלקים לגליצרו-פוספוליפידים וספינגוליפידים- תלוי מה השלד של המולקולה.



תחילה **הגליצרו-פוספוליפידים**: שלד המולקולה הוא גליצרול. הוא מכיל שלושה פחמנים, שלכל אחד מהם יקשר רכיב נוסף. לפחמן התחתון יקשר רכיב פולרי- פוספט שקשור בקשר אסטרי לאלכוהול. זה יצור את הצד הפולרי של הפוספוליפיד.

לשני הפחמנים האחרים יקשרו שתי חומצות שומן. הם יצרו את הצד הא-פולרי של הפוספוליפיד.

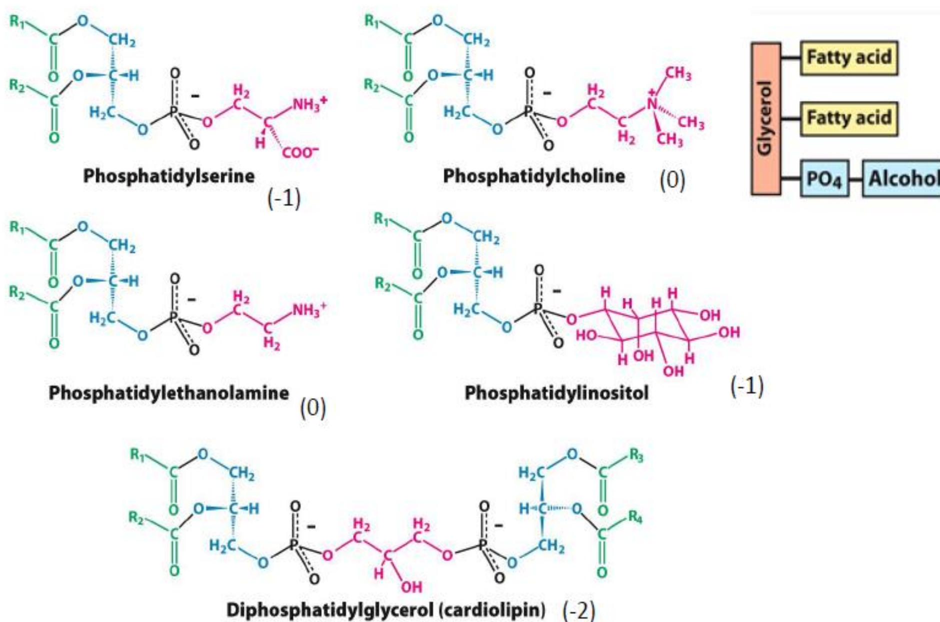


דיאציל-גליצרול-3-פוספט/**פוספטידאט** היא מולקולת ביניים בדרך להיווצרות הפוספוליפיד. היא מכילה את שלד הגליצרול (בשחור), את שתי חומצות השומן (בירוק) ואת הפוספט (בורוד), בלי האלכוהול.

*היא גם דומה לדיאציל-גליצרול (DAG), מולקולה הקשורה בהעברת סיגנלים.

החומצות שומן נקשרות אל פחמנים 1 ו-2 של הגליצרול, בקשרים אסתרים. הפוספוריל נקשר לפחמן 3 ונותן למולקולה מטען שלילי.

האלכוהול שמתלבש על הפוספט יכול להיות מסוגים שונים, מה שמאפשר לקבל מגוון של פוספו-גליצרידים, בעלי מטען שונה:



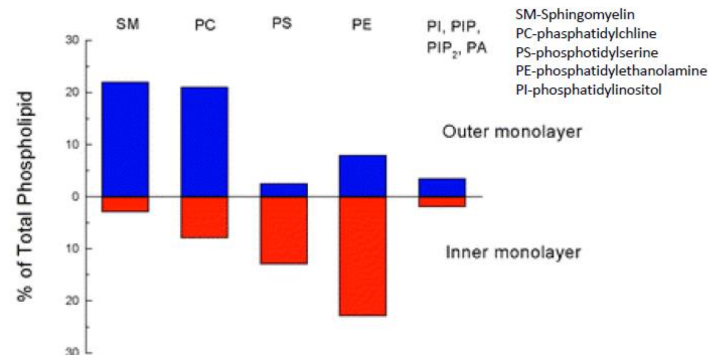
הפשוט ביותר הוא של כהל מסוג גליצרול. אותו הגליצרול יוכל לקשור מצידו השני עוד פוספטידאט, כי יש לו שתי קבוצות OH שיכולות לעשות קשרים אסתרים. יתקבל די-פוספטידילגליצרול, שמכונה גם **קרדיוליפין**. זה המרכיב העיקרי בממברנה הפנימית של המיטוכונדריה.

מעבר לכך הכהלים האפשריים הם סרין, אתנולאמין, כולין ואינוזיטול.

האינוזיטול בעצמו יכול לעבור כמה פוספורילצות, וכך להגדיל את המגוון של הפוספוליפידים.

כאמור, אם מסתכלים על פיזור הפוספוליפידים בממברנה, מוצאים שיש אי סימטריה בין הצד החיצוני והפנימי. בצד הפנימי מוצאים יותר פוספוטידיל סרין (הוא מעודד מוות תאי, לכן הוא בצד הפנימי) ופוספוטידיל-אתנולאמין. בצד החיצוני מוצאים יותר ספינגומיאלין ופוספטידיל-כולין.

פוספו-אינוזיטול מצוי בשני צידי הממברנה.

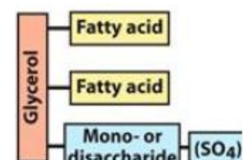


המורכבות גדלה עוד יותר- לכל פוספוליפיד יש מספר מינים, כתלות בחומצות השומן שקשורה לגליצרול. חומצת השומן יכולה להיות רוויה ולא רוויה, מספר הקשרים הכפולים יכול להשתנות, ומספר הפחמנים יכול להשתנות.

בדר״כ, חומצת השומן בעמדה R1 היא רוויה, ובעלת 16 או 18 פחמנים ; וחומצת השומן בעמדה R2 היא לא רוויה- יכולה להיות MUFA או PUFA, בעלת 18 או 20 פחמנים.

הפיזור של הפוספוליפידים משתנה בין רקמות שונות, אורגניזמים שונים.

גליקוליפידים : ההבדל בין הגליקוליפידים לפוספוליפידים הוא בקבוצת הפולרית שקשורה לשלד. הגליקוליפידים לא מכילים את הפוספט על פחמן 3, אלא קשורים לסוכר. השלד עדיין יכול להיות גלירצול או ספינגוזין.

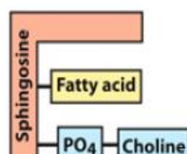


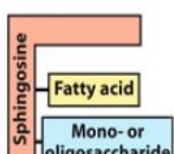
גלקטוליפידים מופיעים בעיקר בצמחים, בכלורופלסט.

שתי חומצות השומן הן לא רוויות מסוג PUFA.

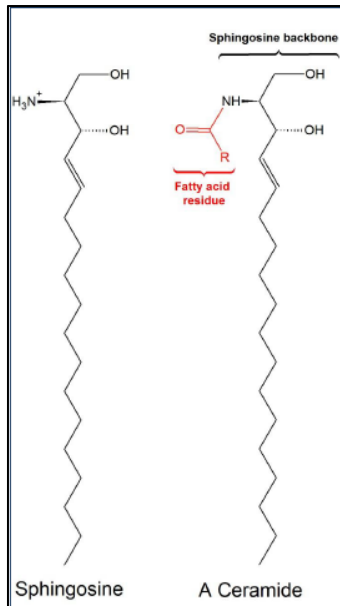
החלק הפולרי הוא של גלקטוז אחד או שניים (די-סכריד). זו קבוצה לא טעונה.

ספינגוליפידים מורכבים משלד של ספינגוזין. הם שייכים גם למשפחת הפוספוליפידים, ובמקרה זה הם יכילו פוספט וכהל כלשהו, וגם למשפחת הגליקוליפידים, ובמקרה זה יכילו סוכר (או מונו-סוכר או פולי-סוכר).





הספינגוזין היא מולקולה שבבסיס שלה יש שלושה פחמנים, שדומים לשלד הגליצרול, אבל בזנב שלה יש חומצת שומן. חומצת השומן בעצם קשורה לפחמן השלישי של השלד. לכן תקשר אליו רק עוד חומצת שומן נוספת, בקשר אמידי.



הספינגוזין היא מולקולה של 18 פחמנים הקשורה לשני כהלים וקבוצת אמיד. אל האמיד נקשרת חומצת השומן. ספינגוזין שקשורה אליו חומצת שומן נקרא **צרמיד.**

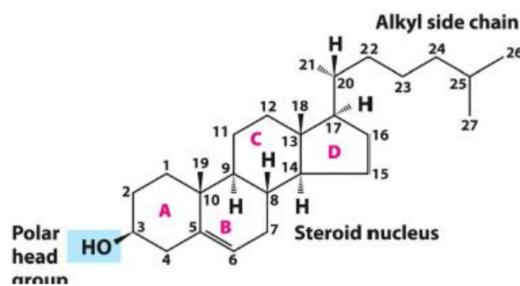
הקבוצה שתקשר אל הפחמן העליון של הצרמיד, תקבע את סוג הספינגוליפיד :

1. צרמיד שנקשר לפוספוריל-כולין או פוספוריל-אתנולאמין יוצר **ספינגומיאלין**. הם כמובן שייכים למשפחת הפוספוליפידים.
   ספינגומיאלין חשובים בממברנה של סוג מסוים של תאי גליה, שיוצרים את מעטפת המיאלין של נוירונים.
2. צרמיד שקשור לשייר סוכר יוצר **גליקוליפידים טבעיים**.
   במידה ושייר הסוכר הוא בודד, אלו צרברוזידים. בנוירונים נפוץ שייר סוכר של גלקטוז, בתאים שאינם נוירונים נפוץ שייר סוכר של גלוקוז.
   במידה ושייר הסוכר הוא של שני סוכרים או יותר, אלו גלובוזידים. שיירי הסוכר יכולים להיות מגוונים : די-גלוקוז, די-גלקטוז, N-אציטל-דיגלקטוזאמין.
3. צרמיד שקשור לאוליגוסכריד המחובר לחומצה סיאלית אחת או יותר יוצר **גנגליוזינים**. אם ישנו שייר אחד חומצה סיאלית זה יהיה GM ganalioside, אם יהיו שני שיירי חומצה סיאלית GD ganaliodise וכן הלאה (GT=3, GQ=4). גנגליוזידים- מצויים בגנגליונים (צבר של תאי עצב). החומצה הסיאלית מקנה לספינגוליפידים הללו מטען שלילי ב-pH7.

יש סדרה של מחלות מולדות שנובעות מחסרים באנזימים בתהליכי סינתזה/פירוק של גנגליוזידים. ביניהם הטיי-זקס, מחלת גושה.

ידועים היום 60 ספינגוליפידים שונים באדם. רק למעטים יש פעילות ביולוגית ידועה. יודעים כי לחלקם יש תפקיד בהעברת אותות.

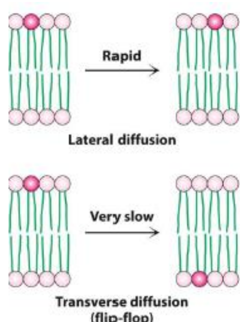
כולסטרול:



הליפיד השלישי הנפוץ בממברנה. זו מולקולה בת ארבע טבעות פחמניות שונות, מה שמקנה לה קשיחה רבה (אין סיבוב חופשי סביב פחמני הטבעת). יש לה ראש פולרי וזנב אלקילי. לכן זו מולקולה אמפיפטית.

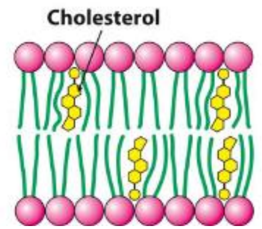
לכולסטרול יש הרבה תפקידים בגוף, אחד מהם הוא ייצוב של הממברנה. בין היתר הוא פרה-קורסר להרבה הורמונים. הוא אינו קיים בפרוקריוטים.

נרחיב יותר על התפקיד של כולסטרול בבקרה על פלואידיות הממברנה.

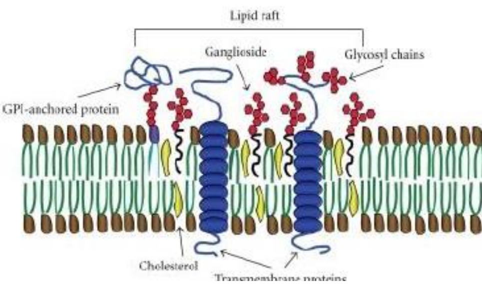


ברגע שיש בממברנה יותר פוספוליפידים עם חומצות שומן בקשרים כפול, תהיה לה יותר פלואידיות. בממברנה פלואידית, יכולה להיות תנועה לטרלית של הפוספוליפידים. תנועה זו מתרחשת כל הזמן והיא מהירה. זאת בשונה מהתנועה של הפליפ-פלופ, שבה פוספוליפיד עובר מהצד הציטוזולי לצד החיצוני או להיפך. זו תנועה מאוד לא שכיחה.

מאחר והחלבונים משובצים בתוך הליפידים של הממברנה, בעת התנועה של הפוספוליפידים, הם גם ינועו (אלא אם הם באינטראקציה המגבילה אותם).



כולסטרול עובר אינטראקציות הידרופוביות ומאוד מייצב את כל הממברנה. בטמפ' נמוכה, הוא נכנס בין חומצות השומן ומונע את הקריסטליזציה ביניהם. כך הוא שומר על מבנה נוזלי ופלואידי. בטמפ' גבוהה, המולקולות מראש יותר רחוקות אחת מהשנייה. כך הממברנה היא יותר חדירה למולקולות קטנות הידרופיליות. הכולסטרול נכנס במרווחים ומייצב את הממברנה- מקטין את הפלואידיות שלה ואת החדירות שלה. בעצם בזכות העובדה שהכולסטרול לא ממש מושפע מתנאי הסביבה של חום וקור (בניגוד לפוספוליפידים), הוא מגן על הממברנה בחשיפה לתנאים השונים. התפקיד שלו תלוי בסביבה החיצונית.



הכולסטרול יכול לעשות אינטראקציות עם ספינגוליפידים, גליקוליפידים וחלבונים. באזור בו זה יקרה, תרד הנוזליות של הממברנה, ויוכלו להיווצר אזורים יחסית יציבים, עם פחות תנועה, בהם הרכב החלבונים הוא יחסית קבוע. אזורים אלו נקראים **Lipid rafts**. זה חשוב כדי לאפשר אוליגומריזציה של חלבונים.

<u>ליפידים לצורכי אנרגיה</u>

טריגליצרידים בנוים משלד גלירצול, שעליו מולבשות 3 חומצות שומן. לכן הם לא פולרים ומאוד הידרופובים, והרבה פחות מסיסים במים מפוספוליפידים. זה עושה אותם חומר אגירה מצוין, כי אין צורך "לבזבז" שטח אגירה על מים.

טריגליצרידים פשוטים - כל שלושת חומצות השומן זהות.
טריגליצרידים מעורבים - חומצות השומן שונות זו מזו.

בתא שומן, הציטופלסמה מלאה בטיפות שומן, כמעט שאין ציטוזול מימי. לגוף חשוב לאגור שומן לזמנים של רעב. מפירוק של חומצת שומן משתחררת המון אנרגיה, הרבה יותר מאשר בקטבוליזם של פחמימות. הפירוק של חומצות השומן נעשה על ידי ליפזות.

למעט אגירה של אנרגיה, לתאי שומן יש גם תפקיד בבידוד. הם נפוצים בבע"ח שחיים באזורים קרים.

בצמחים ובחרקים, שעווה היא חומר קריטי. שעווה היא מבנה מסודר של המון חומצות שומן ארוכות שקשורות זו לזו. זה חומר שאינו חדיר למים, ובעל טמפ' התכה גבוהה מאוד. בטבע נמצא על כיסוי של עלים, על קליפות של כל מיני פירות, שעוות הדבורים ועוד.

<u>ליפידים כרגולטורים</u>

ליפידים המשמשים לרגולציה הם הורמונים, שליחים שניונים וקו-פקטורים לאניזימים.

1. **הורמונים-** הורמונים הסטרואידים הם נגזרות של הכולסטרול. הם נבדלים מהכולסטרול בזנב האלקילי, במקומו יש להם כל מיני מולקולות פולריות. הורמוני המין והסטרס הם סטרואידים. יש כמה תרופות שמבוססות על סטרואידים.
2. **שליחים שניוניים במעבר אותות.** יש סיגנלים שמפעילים פוספוליפזות, אשר מפרקות את הפוספוליפידים של הממברנה לצורך של העברת אותות. למשל PLC חותך את הפוספואינוזיטול לשניים- IP3 ו-DAG. ה-IP3 משחרר קלציום מהמאגרים התוך תאיים, והקלציום מתחבר ל-DAG ומשפעל PKC (עוד שליח שניוני).

   PLA_2 חשובים ליצירת איקסונואידים, שחשובים בתהליכי דלקת. איקסונואידים הם בעלי השפעה פארקרינית, קצרה מאוד בזמן. הם משפיעים על החדירות של הממברנה ומגדילים את חדירות כלי הדם. כך הם עושים ואזו-קונסטריקציה ואזו-דיליטציה.
3. **ויטמינים.** משמשים הרבה פעמים כקו-פקטורים של אנזימים. ויטמינים מסיסי שומן- ויטמין A, שחשוב לפיגמנט בעין, וויטמין K, שחשוב לקרישת דם. הגוף לא מייצר אותם לבד, צורכים אותם בדיאטה. הם חשובים לעיכול של שומנים.

<u>שיטות עבודה עם ליפידים</u>

הם לא מסיסים במים ולכן לא פשוט לעבוד איתם. צריך ממסים אורגנים. בעבר היה נהוג להפריד ליפידים על ידי מידת המסיסות בממסים שונים- מריצים אותם בג'ל והם נפרדים על פי מסיסות. אפשר היום להפריד גם בשיטות של MS.

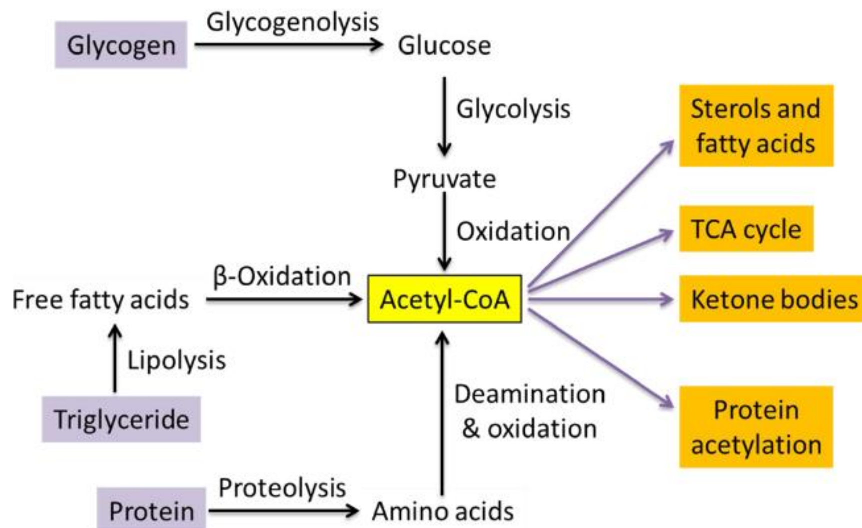
<u>חמצון/פירוק של חומצות שומן - ביתא אוקסידציה</u>

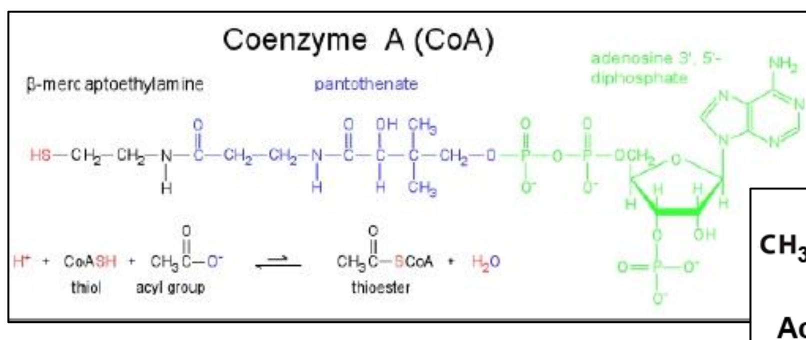
אופן הפקת האנרגיה מחומצות שומן. חומצות שומן הן המקור העיקרי לאנרגיה בגוף, כי הן נותנות בערך פי 2 אנרגיה מגלוקוז. מולקולות שומן הן מקור טוב לאגור אנרגיה כי הן לא מסיסות במים, ולכן הנפח שלהם הרבה יותר נמוך.

שומנים מאוכסנים בתאי השומן כטיפות שומן, ובנוסף יש שומן בשריר ומתחת לעור.

פירוק השומנים נעשה על ידי אנזימים ממשפחת הליפאזות. כל הפירוק נעשה במיטוכונדריה (לעומת הביוסינתזה של חומצות שומן שנעשת בציטופלסמה).

במטבוליזם של חומצות שומן אבן הבניין היא אציטל קו-A. היא תוצר הפירוק של הטריגליצרדים והפוספוליפידים, והיא גם אבן הבניין חזרה לסינזה של חומצות שומן (ומהם טריגילצרידים ופוספוליפידים, והכולסטרול). כפי שראינו גם בפרק הקודם, אציטל קו-A מקשרת בין כל המסלולים המטבולים- גם לפחמימות וחלבונים :





האציטל קו-A : את מבנה הקו-A לא צריך לזכור (מה שבירוק, כחול ושחור). יש לו בקצה קבוצת SH חופשית, הקשורה בקשר אסטרי לשאר המולי'. קבוצת ה-SH החופשית יכולה להתחלף בקבוצת אצטט, ואז זה אציטל קו-A. את מבנה קבוצת האצטט צריך לזכור.

מקורות השומן בגוף : דיאטה, סינתזה בכבד מחומרי גלם, טריגליצירידים במאגרי השומן.

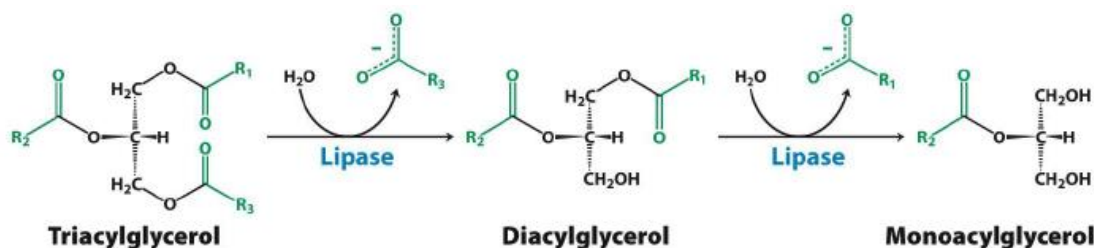
40% מהמזון הוא שומן. השומן נאגר כטריגליצרידים (בתאי השומן, בשריר ומתחת לעור), ובעת מחסור הוא נצרך חזרה מהמקורות בהם נאגר, ומגיע לכבד כדי לעבור ביוסיתנזה. במקרים קיצוניים של רעב, טריגלצירידים הם מקור האנרגיה

היחיד-דובים הישנים שנת חורף שורדים את התקופה על ידי פירוק מאגרי טריגליצירידים. באופן דומה, ציפורים נודדות שעוברות מעל אוקיינוסים, מנצלות את מאגרי הטריגליצרידים שלהן, שאגרו בזמן שהיו ביבשה.

<u>תהליך ניצול שומנים במזון</u>

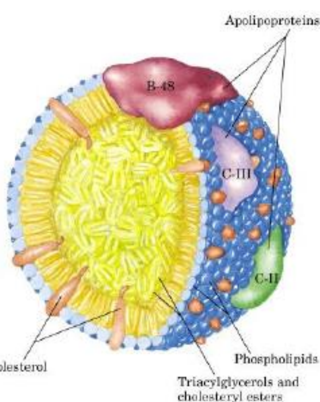
השומנים שנצרכים במזון צריכים להיספג במעי והוא יפריש אותם אל הדם. הם עוברים אל הכבד, עוברים ביוסינתזה, וחוזרים לדם כדי לספק אנרגיה לשרירים, למוח ולשאר האיברים. השומנים הם לא מסיסים במים, ולכן הם צריכים מערכת שתוביל אותם בתווך המימי. לשם כך הם יעברו מספר תהליכים של פירוק, הרכבה מחדש לחומרים אמפיפטים שיודעים לנוע בזרם הדם, ושוב פירוק בתאי המטרה.

בחלל המעי: יצירה של אמולסיה (תחליב) מהשומנים שנצטרכו במזון. זה נעשה בעזרת מלחי מרה. הכבד מייצר מלחי מרה, ומאכסן אותם בכיס המרה. כאשר אנחנו אוכלים שומנים, מלחי המרה מופרשים אל המעי, שם הם משמשים כדגרגנט- הם יוצרים מיצלות מהשומנים של המזון (כמו סבון). מלחי המרה הן מולקולות דמויות כולסטרול, יש להם זנב ארוך וראש פולרי (עם קבוצת קרבוקסיל), ועל כן הן מולקולות אמפיפטיות. כאשר הן יוצרות מהשומנים טיפות שומן, הטריגליצירידים יותר נגישים לליפזות המפרקות אותן. הליפזות הן כן מסיסות במים, הן מגיעות למעי מתוך הלבלב, ושם הן מפרקות טריאציל-גליצרול ל-2 חומצות שומן חופשיות ומונואציל-גליצרול, בשני שלבים : ליפזה ראשונה חותכת חומצת שומן חופשית אחת, נותר דיאציל-גליצרול, ליפזה שנייה חותכת חומצת שומן חופשית נוספת, נותר מונואציל-גליצרול (שהוא בעצם גם חומצת שומן + הגליצרול).



תוצרי הפירוק האלו (חומצות שומן +גליצרול) נספגים בתאי האפיטל לאורך המעי ע״י דיפוזיה. מלחי המרה ברובם חוזרים לכבד לשימוש חוזר.

בתאי האפיטל במעי: חומצות השומן והמונואציל גליצרול שפורקו יסונתזו מחדש לטריגליצרידים, אשר יארזו בצורה של כילומיקרונים. גופיפים אלו יכולים לנוע בדם ולהגיע אל השרירים (שרירי השלד והלב), לרקמת השומן או לכבד.



כילומיקרון הוא אגרגט של שומנים, שעטוף בפוספוליפידים, ובחלקו הפנימי מכיל טריגליצרידים. הפוספוליפידים הם כאמור אמפיפטים, ולכן הם יכולים לנוע בדם. הטריגליצרידים הם עד 80% מהמסה של הכילומיקרון. בנוסף, בכילומיקרונים יש גם חלבונים מסוג אפוליפופרוטאינים (B-48, C-II, C-III) וכולסטרול. החלבונים הם אלו שמכוונים את הגופיף ואומרים לו מה יהיה יעד המטרה שלו. הרכב שונה של ליפידים וחלבונים מייצרים גופיפים שונים, שלהם צפיפות שונה (HDL, LDL, VLDL).

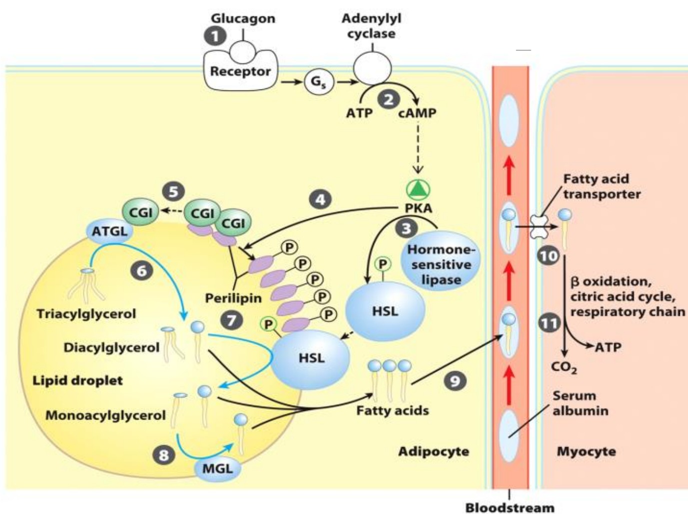
בזרם הדם: הכילומיקרונים מגיעים לקפילות של איברים שזקוקים לשומן- או רקמת השומן שתאגור אותם, או לשריר שינצל אותם להפקת אנרגיה. הכילומיקרון לא נכנס אל התאים אלא פורק את המסה הטריגליצירידית בקפילרות. זה נעשה בעזרת ליפופרוטאין ליפז, אנזים ממברנלי שנמצא בצד הלומינלי של תאי האפיטל של כלי הדם, ומפרק את הכילומיקרון. ההפעלה של הליפז נעשית על ידי אפוליפופרוטאין C-II. הפירוק של הטריגליציריד יהיה עד לחומצות שומן חופשיות וגליצרול,

והם יעברו uptake אל תוך תאי האיבר. כאמור, בתאי השריר הם ינוצלו להפקת אנרגיה, ובתאי השומן הם יורכבו מחדש כטריגליצרידים. בדם ישארו השיירים האחרים של הכילומיקרונים- בעיקר כולסטרול, ליפופרוטאינים ומעט טריגליצירידים. הם יכנסו לכבד בעזרת רצפטורים מיוחדים של ליפופרוטאינים, שיעשו שימוש בחומרים שנותרו בהתאם לצרכים שלו – בעת רעב יפורקו הטריגליצרידים לגופיפי קטו (תחליף לגלוקוז, נרחיב בהמשך), ובשובע הם ישמשו לאגירה.

בתוך התאים: בציטופלסמה של תאי השומן (**אדיפוציטים**), השומנים נאגרים כטיפות שומן. טיפות השומן מכילות טריגלצירידים וכולסטרול בליבה, ופוספוליפידים במעטפת. בנוסף, טיפות השומן מוקפות במעטפת חלבונים של perilipins. הפריליפינים מגינים על חומצת השומן.

על מנת שיהיה אפשר לנצל את הטריגליצרידים האלו בשעת צורך, ולהסיע אותם לאיברים אחרים, הם צריכים להיות מפורקים ל-free fatty acid (FFA). כיצד קורה התהליך?

בזמן רעב, הורמון גלוקגון מופרש (וגם אפינפרין), הוא נקלט ברצפטור מסוג GCPR על פני האדיפוציט. זה מפעיל אדניל ציקלס, שמפעיל cAMP, שמזרחן PKA, שמזרחן את הפריליפין.



זרחון הפריליפין גורם לשני דברים:

(א) משתחרר CGI, שמהווה קו פקטור ל- ATGL (ליפז של אדיפוציטים), ולכן הוא הופך פעיל. זה אנזים שיודע לעשות פירוק של טריאציליגליצרול עד לדיאציל-גליצרול ו-FFA.

(ב) המבנה של טיפת השומן משתנה, וכך היא נגישה לליפז.

בנוסף, ה-PKA המזורחן מפעיל HSL-hormone sesative lipase. זה ליפז שיכול לפרק את הדיאציל-גליצרול (שנוצר ע"י ה-ATGL) למונואציל גלירצול ו-FFA. אז ליפז בשם MGL (מונואציל גליצרול ליפז) מפרק את המונואציל-גליצרול לעוד FFA ולגליצרול.

כל אותן חומצות שומן חופשיות יצאו אל זרם הדם. כדי שיוכלו לנוע בזרם הדם הן צריכות להיות קשורות לחלבון בשם אלבומין. זה חלבון שתפקידו הראשי הוא לווסת לחץ אוסמוטי, אבל הוא גם יכול לשאת חומצת שומן. לכן הוא מאוד נפוץ בדם- הוא מהווה 50% מחלבוני הסרום. חלבון אלבומין אחד יכול לשאת עד 10 חומצות שומן חופשיות. כאשר הוא מגיע לתא השריר, טרנספורטר לוקח את החומצה שומן החופשית מהאלבומין לתוך התא, והיא עוברת פירוק.

הגליצרול שנותר מפירוק הטריגליצרול נספג **בכבד**. שם יש אנזים בשם גליצרול קינז, שהופך אותו בסדרה של ריאצקיות ל-DHAP ו-G3P. הם יכולים להיכנס למסלול הגליקוליזה או הגלוקוניאוגינזה- תלוי במה שהתא צריך.

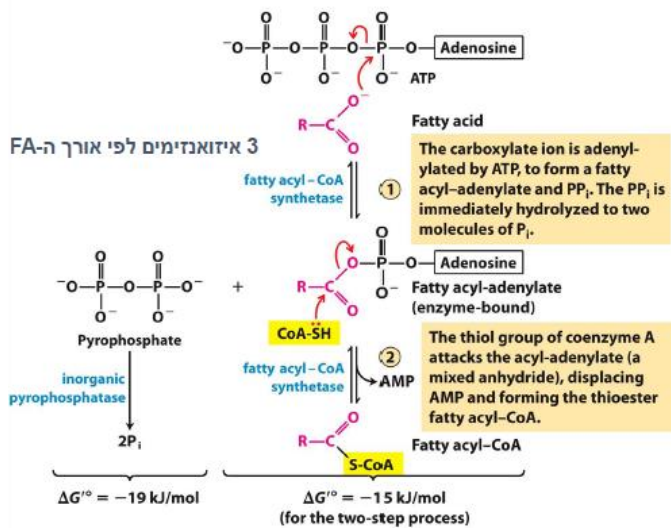
בשריר: חומצות השומן החופשיות יפורקו בתהליך הביתא-אוקסידציה לאציטל קו-A, שממנו ניתן להפיק ATP במעגל קרבס וזרחון חמצוני. אבל לשם כך, חומצות השומן צריכות להגיע למיטוכונדריה. למיטוכונדריה שתי ממברנות, החיצונית יחסית חדירה בגלל הפורות, אבל הפנימית כלל לא חדירה- לא לחומצות שומן ולא לאציטל קו-A. כדי לחדור אותה, חומצות השומן משתמשות **carnitine shuttle**. אותו השאטל אחראי למידור בין הפירוק והבנייה של חומצות שומן (פירוק במיטוכונריה, בנייה בציטופלסמה).

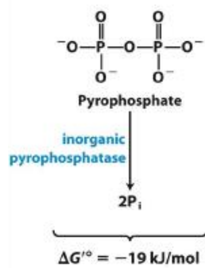
הקרניטין שאטל עובד בשלושה שלבים:

1. שפעול של חומצת השומן על ידי קשירה לאציטל קו-A. זה נעשה על ידי אציל קו-A סינתטז 1 (קרוי גם FA תיאוקינז). אנזים זה יושב על הממברנה החיצונית של המיטוכונדריה, והוא ה-rate limiting step של התהליך. יש מגוון של

סינתטזות כאלו, כל אחד מטפל בחומצות שומן באורך אחר.

חומצות שומן קצרות (מתחת ל-10) לא צריכות את השאטל, הן יכולות לעבור בדיפוזיה. אבל יש מעט כאלו.



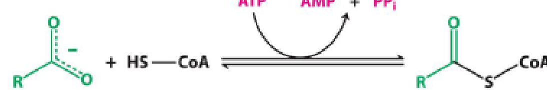


תהליך זה דורש השקעה של ATP, והוא נעשה בשני שלבים.

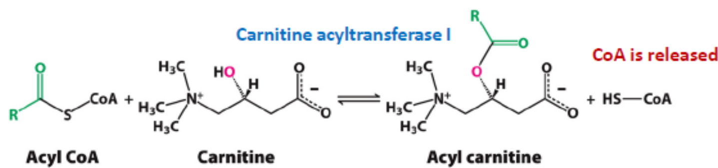
תחילה ה-ATP מתפרק : 2 פוספטים שלו משתחררים (זה הפירופוספט) והחלק הנותר (AMP) נקשר אל חומצת השומן וכך נוצר אציל-אדנילט. הפירופוספט נע החוצה בדיפוזיה, ולכן תהליך זה לא הפיך.

בשלב הבא, אציטל קו-A מחליף את ה-AMP ונקשר אל חומצת השומן. נוצר Fatty-acyl coA.



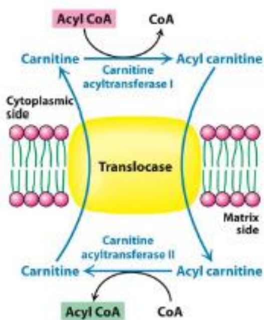


2. קרניטין אציל-טרנספרז 1 – **CAT1** (קרוי גם CTP) הוא טרנספורטר שמעביר את חומצת השומן המשופעלת את הממברנה החיצונית של המיטוכונדריה.



הקרניטין הוא כהל ארוך עם מטען חיובי ושלילי. בזכות המטען הוא קושר אליו את האציל עם חומצת השומן.

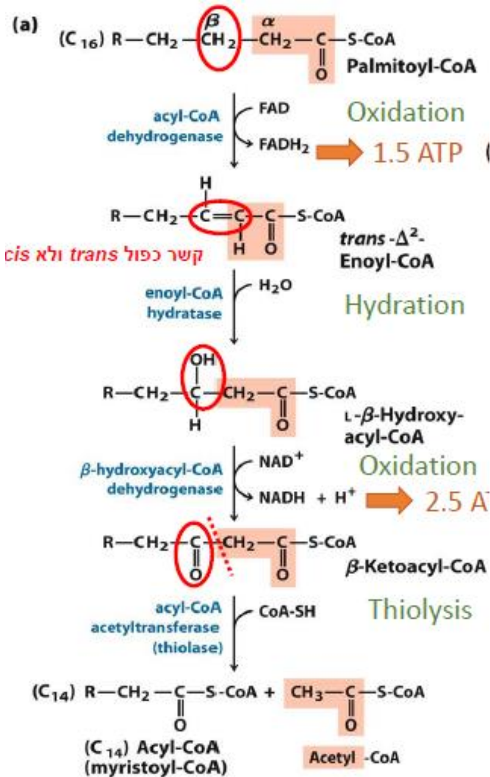
הקו אנזים A משתחרר.



3. טרנספורטר נוסף, **CAT2**, מעביר אותם דרך הממברנה הפנימית. הוא עושה את הריאקציה ההפיכה ל-CAT1- מפרק חזרה לקרניטין חופשי ואציל קו-A. במטריקס נותר אציל קו-A עם חומצת שומן. הקרניטין החופשי חוזר חזרה לתווך הבין ממברנלי לסיבוב נוסף של השאטל.

יש מחלה שנובעת מחסר באצילטרנספרז (CAT). זה מתבטא בחולשת שרירים אחרי פעילות גופנית כי לגוף אין יכולת להכניס את חומצת השומן למיטוכונדריה לפירוק, ולכן אין מספיק ATP. זה יכול להיות חסר ב- CAT1 או CAT2. זו מחלה אוטוזומלית רצסיבית נדירה. במקרים הקיצונים של מופע המחלה זה גורם למוות. לחולים יש פירוק של מעט חומצות שומן- אלו שקצרות מ-10 פחמנים, כי הן לא צריכות את השאטל כדי להיכנס למיטוכונדריה.

במיטוכונדריה: חומצות השומן מתפרקות להרבה אציטל קו-A. הוא ממשיך למעגל קרבס ולשרשרת מעבר האלקטורנים ולזרחון חמצוני לקבלת ATP. הפירוק של חומצות השומן נעשה מהקצה הקרבוקסילי. בעת הפירוק, בין אם זו חומצה עם מספר זוגי של פחמנים או אי זוגי של פחמנים, כל פעם יורדים שני פחמנים בצורה של אציטל קו-A. כל סבב בו מפורקים שני פחמנים נקרא **ביתא-אוקסידציה**.



ביתא-אוקסידציה של חומצת שומן רוויה :

1. שלב אוקסידציה : אנזים אציל קו-A דה-הידרוגנז : שני אלקטרונים של פחמן ביתא נתרמים ל-FAD. נוצר קשר כפול בקונפיגורציה טרנס בין פחמן אלפא לפחמן ביתא, ו-$FADH_2$.
2. שלב הידרטציה : אנזים אנול קו-A הידרטאז : נכנסת מולקולת מים, על פחמן ביתא מוסף הידרוקסיל, על פחמן אלפא מימן.
3. שלב אוקסידציה : אנזים ביתא הידרוקסיל קו-A דה-הידרוגנז : ההידרוקסיל תורם אלקטרון ל-NAD^+. נוצר קשר כפול בין פחמן ביתא לחמצן, ונוצר NADH.
4. שלב תיאוליזה : אנזים תיאולז (או אציל קו-A אציל טרנספרז) : הקשר בין פחמן ביתא ופחמן אלפא נשבר. התוצרים הם אציטל קו A (שמכיל את הפחמן אלפא והפחמן הקרבוקסילי של חומצת השומן) ואציל קו-A עם שאר השרשרת של חומצת השומן. כעת לשרשרת החדשה יש קצה קרבוקסילי חדש (ועליו קו-אנזים A גם).

בתהליך הזה נוצרו $FADH_2$, NADH, אציטל קו-A, וחומצת השומן הצטמקה בשני פחמנים.

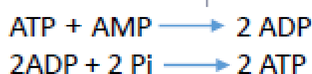
מפירוק של שני פחמנים בלבד, הרווחנו 14 מולקולות ATP :

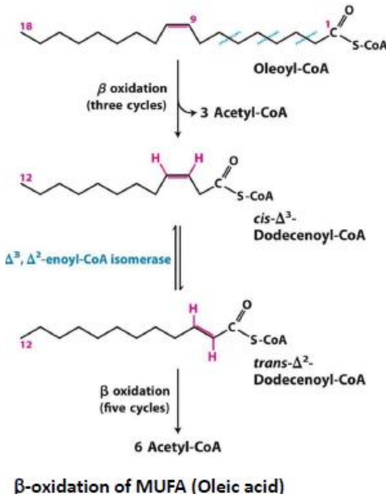
ה-$NADH+FADH_2$ שווים יחד 4ATP (בשרשרת מעבר האלקטורנים וזרחון חמצוני). האציטל קו A שווה עוד 10 ATP (במעגל קרבס : $3NADH + FADH_2 + ATP$).

אפשר לחשב ולראות שמפלמיטאט (16 פחמנים) אחד מקבלים 106 מולקולות ATP.

	כללי	Palmitoyl (16:0)	כמה ATP נקבל מכל מולקולה	סה"כ ATP
כמה acetyl-CoA נקבל?	n:2	8	10	10 x 8 = 80
כמה סיבובים של חימצון-β?	(n:2)-1	7		
בכל סיבוב נקבל:	1x NADH 1 x $FADH_2$		2.5 1.5	2.5 x 7 = 17.5 1.5 x 7 = 10.5
				108
אבל השתמשנו בשווה ערך של 2 x ATP לאקטיבציה של ח' שומן כדי שתיכנס למיטוכונדריה				108-2=106
לכן, סה"כ הרווח האנרגטי של פירוק פלמיטט הוא 106 מולקולות ATP				

*לזכור שכדי להכניס את חומצת השומן למיטוכונדריה היינו צריכים לשפעל אותה ולשם כך השקענו מולקולת ATP שהתפרקה ל-AMP. זה כמו בזבוז 2 מולקולות ATP.





β-oxidation of MUFA (Oleic acid)

ביתא-אוקסידציה של חומצת שומן חד לא רוויה-MUFA :

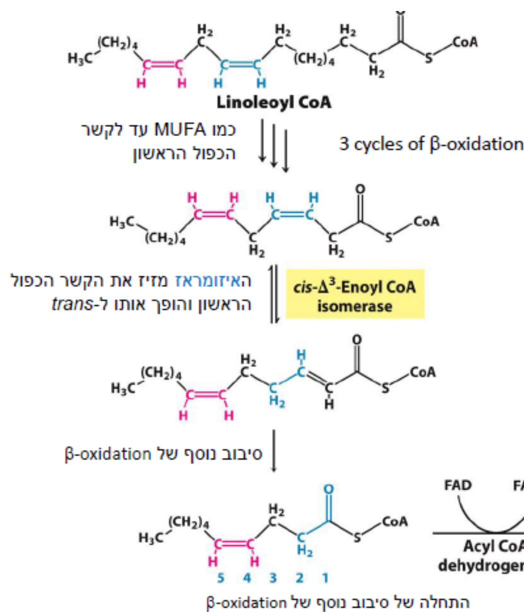
גם היא תעבור שפעול (קשירה לאציל קו-A) כדי להיכנס למיטוכונדריה.

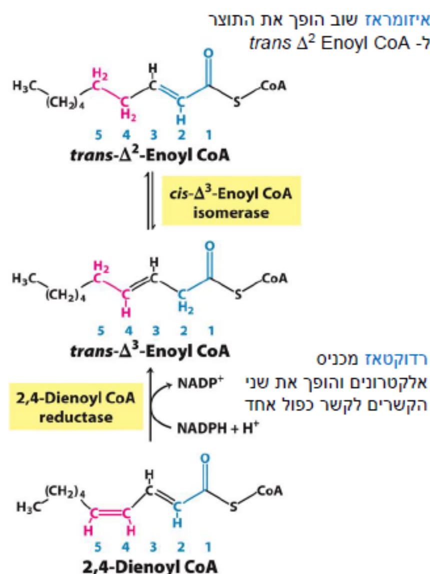
הפירוק יתחיל אותו הדבר- יהיו שלושה סביבים רגילים של הוצאת אציטל קו-A. (לזכור שהקשר הכפול הראשון יהיה על פחמן 9, לכן בכל הדוגמאות שניקח ישתחררו קודם 3 אציטל קו A באופן רגיל).

לאחר שלושה סבבים, הקשר בין הפחמן ביתא הנוכחי לגמא הנוכחי הוא בקונפיגורציה ציס. האנזים הידרטאז יתקע- הוא יודע לעבוד רק בקונפיגורציה של טרנס. אז נכנס אנזים ביניים- איזומרז, שמעביר את הקשר הכפול לטרנס, וגם מעביר אותו להיות בין פחמנים אלפא וביתא (הוא היה בין ביתא לגמא), והתהליך ממשיך רגיל כמו בחומצת שומן רוויה.

בגלל שבסבב של הזזת הקשר הכפול היה דילוג על שלב האציל-קו-A-דה הידרוגנז (לא היה צריך לייצר קשר כפול, כי הוא כבר קיים), נפיק $FADH_2$ אחד פחות, בהשוואה לפירוק חומצת שומן רוויה עם אותו מספר פחמנים.

ביתא אוקסידציה של חומצת שומן רב-לא רוויה- PUFA :





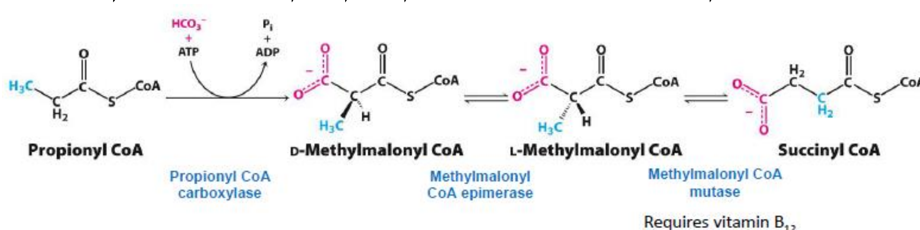
כזכור, בחומצות שומן FUPA אין שני קשרים כפולים סמוכים. עד הקשר הכפול הראשון, השלבים דומים למה שהיה ב-MUFA. ההמשך תלוי באם יש מספר זוגי או אי זוגי של קשרים כפולים.

כאשר יש מספר אי זוגי, התהליך הוא כמו ב-MUFA.

כאשר יש מספר זוגי, צריך גם רדוקטאז, כי בשלב מסוים יש 2 קשרים כפולים סמוכים, וההידרטאז לא ידע מה לעשות. הרדוקטאז הופך את שני הקשרים הכפולים לקשר אחד על ידי תרומה של שני אלקטרונים. קשר זה הוא לא במקום הנכון (הוא צריך להיות בין 2 ו-3 אבל הוא בין 3 ו-4), ולכן איזומרז מעביר אותו למקום הנכון. משם זה ממשיך כרגיל כמו בחומצת שומן רוויה. התהליך הזה "בזבזני" מולי NADH.

ביתא-אוקסידציה של חומצות שומן לא זוגיות :

יש מקרים יחסית מעטים בהם יש חומצת שומן עם מספר לא זוגי של פחמנים. הם יתפרקו תחילה כרגיל, עד שבסבב האחרון מתקבל במקום אציטל קו-A פרופיניל קו-A (שלושה פחמנים על קו אנזים A). אנזים פרופיניל קו-A קרבוקסילז יודע להוסיף פחמן על הפרופיניל קו-A. נוצר תוצר ביניים- מתילמיוניל קו-A, שהוא עם ארבעה פחמנים. לאחר איזומרציה



מתקבל סוציניל קו-A, שהוא גם תוצר ביניים של מעגל קרבס.

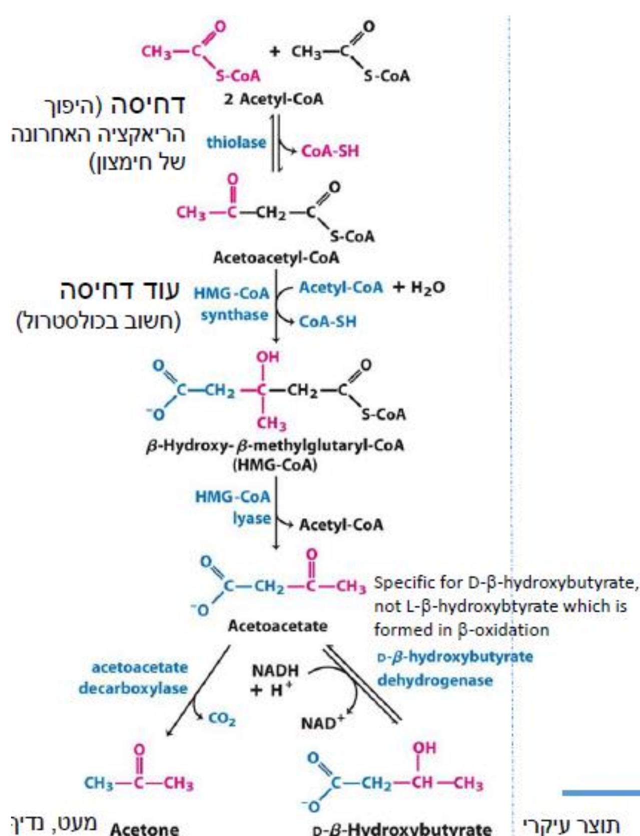
הוא יכול להגיע למעגל קרבס, להפוך לאוקסלואצטט שימשיך עד גלוקוז בגלוקוניאוגינזה. זה משמעותי כי בזמן רעב, פירובט לא יודע לחזור לגלוקוז. אין לא ברירה אלא להמשיך לאציטל קו-A, שיהפוך במעגל קרבס לאוקסלואצטט. אוקסלואצטט אומנם יכול לעבור גלוקוניאוגינזה, אבל הוא לא יצא מהמעגל כדי לעשות את זה סתם כך. צריך שיתמלאו חומרי ביניים של המעגל כדי שתתאפשר יציאה שלו לגלוקוניאוגינזה. המילוי בסוציניל קו-A מאפשר את זה. לכן חומצות שומן אי זוגיות נחשבות מקור גלוקוגני. חומצות שומן רוויות לא נחשבות גלוקוגניות כי הן מתפרקות לאציטל קו-A. כאשר אצטיל קו-A נכנס למעגל, הוא תורם את שני הפחמנים שלו, אבל הם אובדים עד שמגיעים לאוקסלואצטט (משתחררות 2 מולי פד״ח כדי ליצור את ה-NADH). לכן הוא לא יכול להגדיל את מאגרי האוקסלואצטט הזמין לגלוקוניאוגיזה.

אוקסידציה של חומצות שומן מאוד ארוכות :

באוקסידציה של חומצת שומן מאוד ארוכות (מעל 24 פחמנים), צריך קודם לשבור אותן לחומצות יותר קצרות בפרוקסיזום. הן ישברו לחומצות שומן של 8 פחמנים (אוקטיוניל קו-A) ומשם יעברו למיטוכונדריה להמשך פירוק רגיל.

<u>גופיפי קטו</u>

גופיפי קטו הם תחליף לגלוקוז כמקור אנרגיה זמין. בהיעדר גלוקוז, המוח לא יודע לנצל חומצות שומן (אלבומין לא חוצה BBB), אבל כן יודע לנצל גופיפי קטו. רקמות נוספות שמנצלות גופיפי קטו הם השריר והכליה.

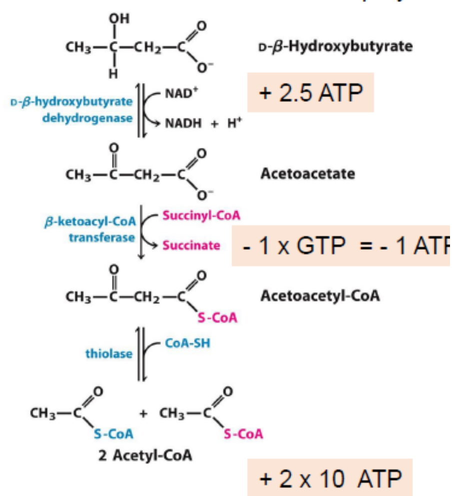


גופיפי קטו נוצרים בכבד מאציטל קו A, שמקורו בחומצות שומן שהגיעו מתאי השומן. הכבד עצמו לא מנצל גופיפי קטו אלא משנע אותם הלאה. גופיפי קטו הופכים חזרה לאציטל קו-A באיברי המטרה, שנכנסים למעגל קרבס. שלושת גופי הקטו העיקריים : אצטון, אצטואצטט וביתא הידרוקסי-בוטיראט.

כאמור, יצירה של גופיפי קטו מתרחשת בזמן רעב (מצב סכרתי או העדר מזון). ברעב, האציטל קו A מתחיל להצטבר בגוף, בגלל הפירוק של חומצות השומן. בכבד, הוא לא עובר למעגל קרבס, כי מעגל קרבס מעוכב בגלל שתוצרי הביניים שלו מופנים לגלוקוניאוגינזה. אז הכבד מפנה את האציטל קו A ליצירת גופיפי קטו. האנזימים לייצור גופיפי קטון נמצאים רק בכבד.

תהליך היצירה של גופיפי קטו : אנזים תיאולז (אותו אנזים מביתא אוקסידציה) דוחס שתי מולקולות אצטיל קו A יחד, ליצירה של אצטואציטל קו A (זה למעשה התגובה ההפוכה ממה שהוא עושה בביתא אוקסידציה). תהיה עוד דחיסה, עם עוד אצטיל קו-A ויתקבל HMG-CoA, שזו מולקולה עם שישה פחמנים.

ליאז יפרק אותו חזרה לאציטל קו A ואצטו-אצטט (הפעם בלי הקו-A), שיהפוך לביתא-הידרוקסיבוטירט (4 פחמנים) תוך פירוק NADH, או לאצטון (3 פחמנים) תוך שחרור פד״ח. ההעדפה היא לביתא הידרוקסי-בוטיראט, כלומר יהיה מעט אצטון. האצטון הוא נדיף ולכן יעלה ריח של אצטון שכשיש ניצול גופיפי קטו.



הביתא הידרוקסיבוטיראט הוא מסיס במים, עובר בדם, מגיע למוח, ובמוח הוא מפורק במסלול הפוך מהיצירה שלו- עד לקבלת שני אצטיל קו-A (תוצרי ביניים-אצטואצטט ואצטואצטיל קו-A. באיור למטה). בכבד אין את האנזים שעושה את הפירוק של הביתא ולכן הוא לא מנצל גופי קטו.

ריכוז גבוה של אצטואצטט וביתא הידרוקסי-בוטיראט בדם מחמיץ אותו וזה מסוכן. כדי לטפל צריך לתת הרבה נוזלים וגלוקוז.

הרווח האנרגטי מגופיפי קטו: ביתא הידרוקסיבוטירט נותן NADH + 2 אצטיל קו-A (שהן שוות 10 ATP כל אחת). יש שלב בדרך שמבזבז ATP אחד (במעבר מאצטואצטט לאצטואציטל קו A). אם כך, מכל ביתא יש 21.5 ATP. אם הכניסה תהיה מאצטואצטט הרווח יהיה 19 (כי לא יהיה NADH).

<u>בקרה על ביתא-אוקסידציה</u>

בקרה לטווח הקצר:

הבקרה היא בשני אנזימי מפתח: CAT-1 ו-ACC (acetyel coA carobcylase) (נדבר עליו בהמשך. זה אנזים המשתתף בסינתזה של חומצות שומן).

בזמן שובע, נרצה לאגור חומצות שומן. תוצר הסינתזה הראשון של ה-ACC הוא מאלוניל קו-A. הוא מעכב את ה-CAT1, ובכך מעכב את פירוק חומצות השומן.
בזמן רעב, אין סינתזה של חומצות שומן, ה-CAT1 יוצא מעיכוב, והוא פנוי לפרק חומצות שומן.

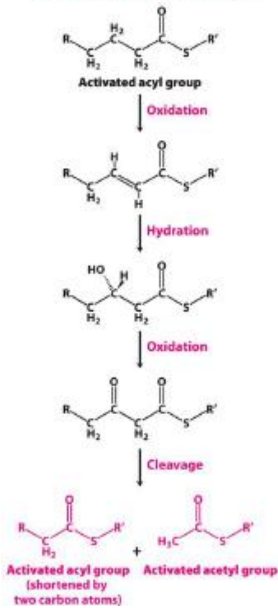
בנוסף יש בקרה הורמונלית על ה-ACC וה-CAT1, ע״י אינוסלין וגלוקגון. אינסולין מופרש ברעב, יוביל לפירוק חומצות שומן. גלוקגון בשובע, יוביל לסינתזה של חומצות שומן.

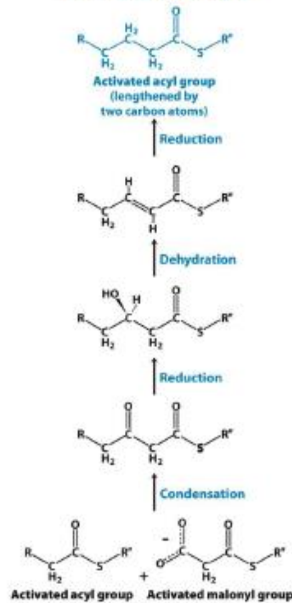
פירוק וסינתזה של חומצות שומן יושפעו גם מהמאזן האנרגטי בתא:

- עודף ב-AMP (יותר מדויק יחס AMP/ATP גבוה) מעכב את אנזים הסינתזה ACC, בכך שהוא מפעיל קינזה שמזרחנת את האנזים ומעכבת אותו --> נוצר פחות מאלוניל קו-A --> העיכוב על CAT1 מוסר --> יש יותר פירוק חומצות שומן.
- עודף באציטל קו-A מעכב אנזים תיאולז--> פחות פירוק חומצות שומן.
- יחס NADH/NAD+ גבוה מעכב אנזים ביתא הידרוקסי קו-A דה הידרוגנז, שמפרק גופיפי קטו.

בקרה בטווח הרחוק:

יש סיגנלים שעושים גם השפעות ארוכות טווח (של שעות עד ימים), בכך שהם מובילים לשינוי בביטוי גנים, על ידי עלייה בפקטורי שעתוק שונים. פקטורי שעתוק מסוג PPAR, יכולים להוביל לעלייה בביטוי גנים ששיכים לאוקסידציה של חומצות שומן.





<u>סינתזה של חומצות שומן</u>

סינתזה של חומצות שומן היא תהליך ראי לביתא אוקסידציה, מבחינת חומרי הביניים, אבל המסלולים הם שונים.

סינתזה של חומצות שומן מתרחשת בציטוזול, בניגוד לפירוק שמתרחש במיטוכונדריה.

האנזימים שמשתתפים בסינתזה נמצאים על פוליפפטיד אחד. נשא האלקטורנים הוא NADPH.

הסינתזה מתחילה מהקצה המתילי ולא הקרבוקסילי.

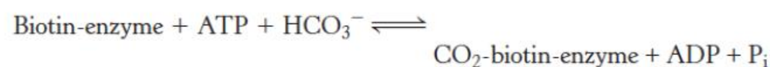
התהליך צורך אנרגיה.

התהליך מתחיל באציטל קו-A. בכל סבב של בנייה, מאריכים את השרשרת בשני פחמנים. במקרה של חומצות שומן לא זוגיות נתחיל בפרופינגיל קו-A.

שלב שפעול:

האציטל קו-A צריך לעבור תחילה שפעול, ולהפוך למאלוניל קו-A. זו מולקולה של 3 פחמנים- מורכבת מאציטיל קו-A ופד״ח.

מדובר בריאקציה של שני שלבים, האחד הפיך והשני לא הפיך, שנעשית על ידי האנזים **ACC1**- acytyl coA carbocylase, שלו יש שלושה מתחמים. האתר הראשון הוא חלבון שנושא מולקולת ביוטין (ויטמין B7). זו קופקטור של אנזימים רבים שעושים קרבוקסילציה. בשלב ההפיך, הביוטין לוקח פחמן מביקרבונט. לשם כך הוא מפרק ATP. זה מתרחש במתחם של ביוטין קרבוקסילז (BC). לביוטין יש זרוע ארוכה, והיא משמשת כדי להזיז את הפד״ח המשופעל ממתחם ה-BC למתחם השלישי- טרנסקרבוקסילז/קרבוקסילטרנספרז (CT). שם האנזים מעביר את הפד״ח המשופעל לאציטל קו-A, בכך הופך אותו למאלוניל קו-A.







זה ה-rate limiting step של הסינתזה, ולכן עיקר הבקרה היא על האנזים הזה. מאחר ומדובר בשלב לא הפיך, יצירת מאלוניל קו-A מחייבת סינתזה של חומצת שומן. אנזים זה נמצא על הממברנה של ה-ER, בצד הציטוזולי.

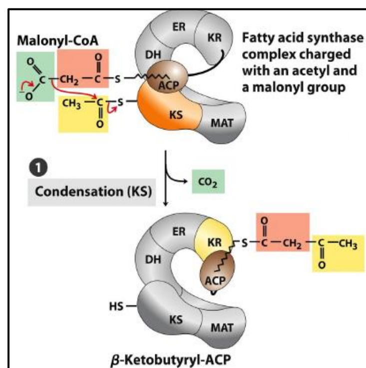
שלבי הסינתזה:

לאחר שיש את המאלוניל אפשר להתחיל את הסינתזה. כאמור, בכל סבב יתווספו 2 פחמנים בצורה של אציטל קו-A.

Fatty acid syntase, **FAS1** הוא האנזים של הסינתזה, והוא יתווך את ארבעת הריאקציות : דחיסה, חיזור, דה-הידרדציה וחיזור נוסף. הוא קומפלקס אנזימתי גדול של 7 מתחמים פעילים, ועוד כמה לא פעילים. הוא פעיל בצורה הומודימרית, והוא כבד מאוד.

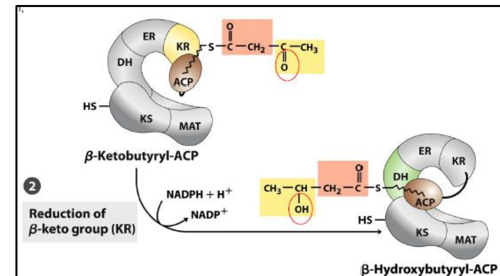
אחד המתחמים שלו נקרא ACP (acyl carrier protein). הוא זה שקושר את המאלוניל קו-A על ידי אסטריפיקציה. ה-ACP הוא חלבון מאוד גדול בעצמו, של 77 ח. אמינו. תוצרי הביניים של הסינתזה לא ישארו חופשיים בציטופלסמה, אלא ישארו קשורים ל-ACP, והוא יזיז אותם ממתחם אחד של ה-FAS1 למתחם אחר.

ה-FAS כולל 2 אתרים עם קבוצת SH. הראשון הוא ה-ACP, שקשור לדומיין אחר שנקרא קטו רדוקטז (KR). קבוצת ה-SH השנייה נמצאת במתחם שנקרא קטו-סינתז (KS), שם נקשר האציטל קו-A שעתיד להתווסף למאלוניל קו-A. בהטענה של האציטל קו-A על ה-KS, הקואנזים A משתחרר, וה-FAS נותר קשור לאצטט.

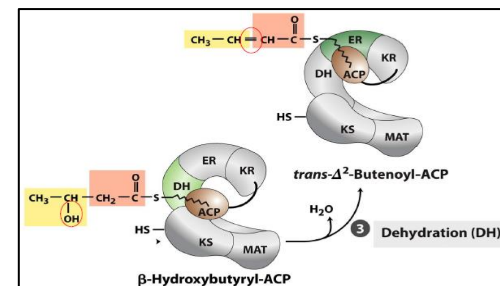


שלב ראשון- דחיסה (ודה-קרבוקסילציה) : לאחר ששני האתרים טעונים- ה-ACP במאלוניל וה-KS באציטל, ה-ACP עושה תנועה ארוכה ומביא את המאלוניל קו-A בסמוך לאציטל. הפד״ח שקודם התווסף על המאלוניל קו-A משתחרר, ועם יציאתו מתרחש חיבור בין האצטט והמאלוניל ונוצר קטו-בוטיריל- מולקולה של 4 פחמנים. היא נשארת קשורה על ה-ACP. האצטט מתווסף על הקצה המתילי של החומצת שומן הנבנת (צד האומגה). כך זה בכל אחד מהסבבים.

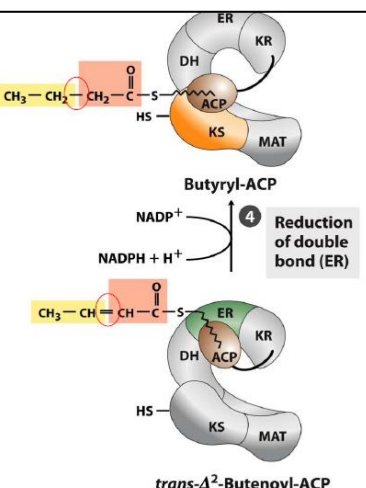
*לא צריך לדעת איפה מתרחשת ההתקפה הנוקלאופילית והיכן עוברים האלקטורנים. צריך לדעת שהפד״ח שקודם השקענו אנרגיה כדי להוסיף אותו, עכשיו יוצא.



שלב שני- חיזור : ה-ACP מביא את הבוטיריל קרוב לקטורדוקטז (KR). בשלב זה יפתח הקשר הכפול בין הפחמן לחמצן בקצה המתילי (הימני). ה-NADPH יהיה נשא אלקטורנים, במקום הקשר הכפול הפחמן ישא קבוצת הידרוקסיל, ויתקבל קטו-הידרוקסיבוטיריל.



שלב שלישי- דה-הידרציה : ה-ACP מביא את ההידרוקסיבוטיריל למתחם ה-DH (הידרוקסיבוטיריל דה-הידרטז). מולקולת מים יוצאת נוצר קשר כפול בין שני הפחמנים (2 ו-3). מתקבל בוטינול.



שלב רביעי- חיזור : הקשר הכפול בין שני הפחמנים נפתח. נשא האלקטרונים הוא NADPH. מתקבל ACP-בוטיריל.

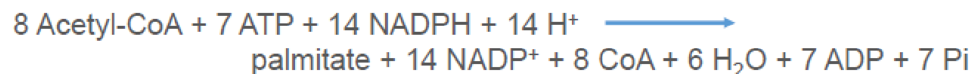
בתום הסיבוב יש חומצת שומן קצרה של ארבעה פחמנים שקשורה אל ה-ACP.

עכשיו צריך להתרחש עוד סבב. הזרוע הארוכה של ה-ACP, שמחוברת לבוטיריל, תנוע ותתקרב אל קבוצת ה-SH של אתר ה-KS. ה-KS יקח את הבוטיריל, כדי לפנות את ה-ACP לקשור מאלוניל חדש. מפה כל השלבים ממשיכים אותו הדבר.

הסבבים האלו יכולים להמשיך עד מקסימום 7 סיבובים. בכל סיבוב אובד פד״ח ו-2 מולקולות NADPH. מתקבל פאלמיטט (חומצת שומן רוויה של 16 פחמנים). שלב זה יכול להיפסק גם לפני 7 סבבים, אבל לא אחרי.

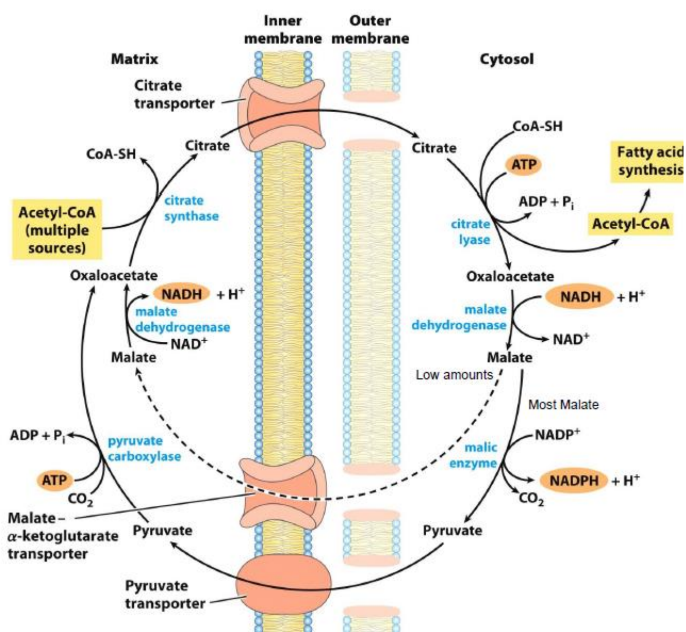
אפשר לשאול מדוע להשקיע ATP על מנת להוסיף פד״ח לאציטל קו-A, ואז בשלב הראשון של הסינתזה הוא מתפרק. ההסבר הוא תרמודינמי. שימוש במאלוניל במקום באציטל הופך את התגובה להיות עם ΔG מאוד שלילי.

הרווח האנרגטי בסינתזה : כדי לייצר פאלמיטט צריך 8 מולקולות אציטל קו-A, שיתחברו ב-7 סבבים. בכל סבב, יש שפעול של האציטל קו-A למאלוניל קו-A ולשם כך דרושה מולקולת ATP, ועל כן בסה״כ ליצירת פאלמיטט נדרשות 7 מולקולות ATP. כמו כן, כל סבב דורש 2 מולקולות NADPH, ולכן בסה״כ מנצלים 14 מולקולות NADPH.



ציטרט שאטל :

האציטל קו-A שנחוץ לריאקציה נמצא במיטוכונדריה, וצריך להגיע לציטופלסמה. לשם כך הוא נעזר בשאטל. השאטל הזה נקרא **ציטרט שאטל**. שאטל זה יבזבז עוד 2 מולקולות ATP (מאחר ויש 8 מולי אציטל קו-A בפאלמיטט, זה 16 מולי ATP).



במעגל קרבס, אציטל קו-A הופך לציטרט ביחד עם אוקסולואצטט. הציטרט יוצא לציטופלסמה, והופך לאוקסלואצטט, תוך שחרור האציטל קו-A וניצול ATP.

כדי לחזור למיטוכונדריה, האוקסלואצטט יהפוך למאלט. חלק קטן של המאלט יחזור למיטוכונדריה דרך שאטל של מאלט, ויכנס למעגל קרבס. במעבר זה אין לנו שום רווח אנרגטי. לכן, רובו של המאלט יעבור קודם לפירובט ואז יכנס למיטוכונדריה בעזרת טרנספורטר של פירובט. האנזים מאליק, שהופך את המאלט לפירובט יצור בדרך NADPH, הנחוץ לסינתזה של חומצות השומן. במיטוכונדריה, הפירובט יהפוך לאוקסלואצטט, ושם תבזבז מולי ה-ATP השנייה.

על כל מולקולה של אציטל קו-A שיוצאת לציטוזול מהמיטוכונדריה מתקבלת מולקולה אחת של NADPH, ולכן בסה״כ לתהליך של יצירת פאלמיטט מקבלים 8 NADPH. שאר מולקולות ה- NADPH שנחוצות (צריך סה״כ 14), מגיעות ממעגל הפנטוז-פוספט.

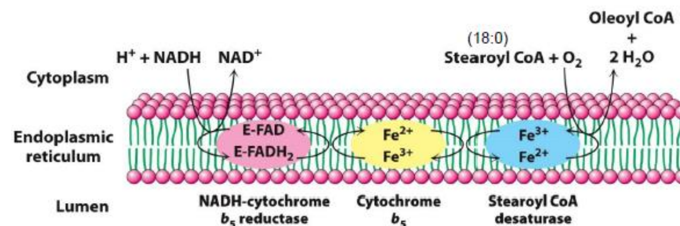
סינתזה של חומצת שומן היא דוגמא לשיתוף פעולה בין הרבה מסלולים מטבולים שונים. גליקוליזה וחמצון זרחוני מספקים ATP. מעגל הפנטוז פוספט, מעגל קרבס וטרנספורט של אוקסלואצטט/ציטרט מספקים את הפחמנים הדרושים ואת הכוח המחזר.

הארכת חומצות השומן :

כאשר מייצרים חומצות שומן ארוכות יותר מ-16 פחמנים, לוקחים את הפלמיטט המוכן ומאריכים אותו. האנזימים שעושים את האלונגציה גם יושבים על ממברנת ה-ER בצד הציטוזולי. באנזימים האלו, הנשא של האציל הוא קואנזים-A, ולא ACP. שאר התהליך הוא דומה- מאלוניל קו-A תורם 2 פחמנים ע״י אותם שלבים : דחיסה, חיזור, דה-הידרטציה וחיזור.

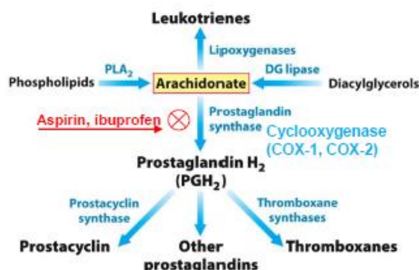
הכנסת קשרים כפולים :

כדי לקבל קשרים כפולים צריך אנזים שעושה דה-סטורציה. אנזים שיושב על הממברנה של ה-ER, אבל בצד של הלומן, יודע לעשות זאת. הוא קומפלקס שמכיל שלושה אנזימים- NADH-cytochrome b5 reductase, cytochrome bs, stearyol CoA reductase. יש פה תהליך העברת אלקטורנים מאחד לשני. לא צריך לזכור את כל חומרי הביניים.



חלק מהאנזימים הנדרשים להכנסת קשרים כפולים, ובעיקר אלו שמכניסים קשרים כפולים אחרי פחמן 9, לא נמצאים ביונקים. לכן יש חומצות שומן מסוימות שחייבים לצרוך בדיאטה. אלו נקראות essential fatty acid. באיור העליון אפשר לראות שחומצות אלו (עם קשרים כפולים אחרי 9) הם הפרה-קורסרים של חומצות שומן ארכידוניות (20 פחמנים).

איקוסנואידים : נגזרות של חומצה ארכידונית, שחשובים בהעברת אותות. הם כוללים את הלויקוטריינים והפרוסטהגלנדינים.



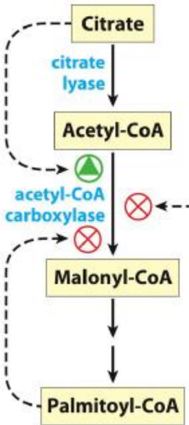
האיקסונואידים עובדים באופן לוקלי ומיידי במצבים של דלקת. הם נקשרים לרצפטורים ייועדים לאיקסונואידים, ומשפיעים על הסביבה המיידית באופן של ואזו-קונסטריקציה או ואזו-דילטציה. הסימן הראשון של דלקת הוא חום, אדמומיות והתנפחות- כולם תוצאה של הרחבת כלי דם.

PLA2 (פוספוליפז A2), מחלץ מממברנת הפלסמה את חומצת השומן הארכינואידית, ואז היא מסונתזת לכל הנגזרות האחרות. אספירין מעכב את הציקלואוקסיגינז (COX1, 2), שהם האנזימים שמסתנטזים את הפרוסטהגלנדינים מהחומצה הארכינואידית.

בקרה על סינתזת חומצות שומן

האנזים שעליו תהיה רוב הבקרה הוא האנזים מגביל הקצב- ACC1. הוא קובע כמה מאלוניל קו-A יהיה זמין לסינתזה של חומצות שומן.

יש עליו כמה רמות של בקרה:



- בקרה הורמונלית: הורמוני הרעב- גלוקגון ואפינפרין מפעילים AMP קינז, אנזים שמזרחן את ה-ACC. הזרחון של ה-ACC הופך אותו ללא פעיל.
  הורמון השובע- אינסולין, מפעיל פוספטאז שמאקטב את ה-ACC בחזרה.
- רגולציה אלוסטרית: אחת היא על ידי ציטרט. ציטרט מפעיל את החלבון MIG12, שעוזר ל-ACC לעשות פולימריזציה-המון מונומרים מתחברים לדימרים, ומצטופפים יחד בצורה של סיב. צורה מאוד פעילה.
- הפאלמיטאט עושה feedback inhibition. הוא מפרק את הפילמנט הזה (ובכך מעכב ACC), מעכב את הטרנסלוקז של הציטרט מהמיטוכונדריה (כך שלא יהיה מספיק אצטיל קו-A להתחיל סינתזה), ומעכב את ה-G6PD במעגל הפנטוז (ועל כן יהיו פחות NADPH שנחוצים לסינתזה).

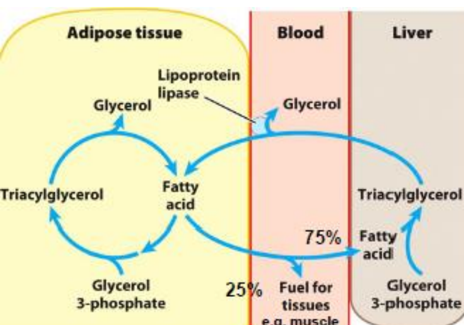
ביוסינתזה של ליפידים וטריגליצרידים

חומצות שומן לא נשארות חופשיות, הן הולכות לסינתזה של טריגליצרידים (צורת אכסון) או לפוספוליפידים (בנייה). הדרך לשניהם עוברת בפרהקורסר משותף- **פוספטידאט**. פוספוטידאט מאוד דומה לדיאציל-גלירצול (גליצרול, עם 2 חומצות שומן, ראש פולרי חלקי- רק הפוספט, ללא הכהל. הכהל הוא ההבדל מה-DAG).

הסינתזה של הפוספטידאט היא על ידי אנזים גליצרול-פוספט-אציל-טרנספרז, שנמצא בממברנה של ה-ER והממברנה החיצונית של המיטוכונדריה. הוא הופך גליצרול-3-פוספט וחומצות שומן לפוספטידאט. המקור ל-G3P הוא בגליקוליזה. בכבד (ומעט בכליה), יש אנזים נוסף, גליצרול קינז, שיכול ליצור G3P ישירות מגליצרול.

טריגליצרידים:

אנזים ליפין (נקרא גם פוספטידט פוספטאז, PAP) מפרק את הפוספטידאט ל-DAG. אנזים נוסף, דיגלצריל אציל-טרנספרז הופך את ה-DAG לטריגלצרידים. שני האנזימים האלו נמצאים בקומפלקס אחד- טריגליצרול סינתז, שיושב על הממברנה של ה-sER.



רוב הסינתזה של הטריגליצרידים היא בכבד, יש גם סינתזה ברקמת השומן אבל זה מיעוט. רוב הפירוק של הטריגליצרידים היא ברקמת השומן. מתרחש פה מעגל של פירוק ובנייה של הטריגליצרידים- ברקמת השומן, הפירוק יוצר גם גליצרול וגם FFA. ה-FFA יוצאים אל הדם, 25% מהם מגיעים לתאים אחרים לצורך פירוק (כדי להפיק אנרגיה) או לבנייה. היתר מגיעים לכבד, שם משמשים כדי לייצר מחדש טריגליצרידים, ששוב יוצאים לרקמת השומן, מתפרקים וחוזר חלילה.

זה מאוד בזבזני באנרגיה. ועדיין גם בזמן רעב יש חזרה של גליצרול וחומצות שומן לכבד לצורך בנייה מחדש של טריגליצרידים. יש מחלוקת האם זה קורה באותו יחס כמו בזמן שובע, או שהיחס הזה משתנה (ל-30% במקום 75%). לא עדיין ברור למה זה קורה, אולי זה לייצור חום, אולי לבקרה.

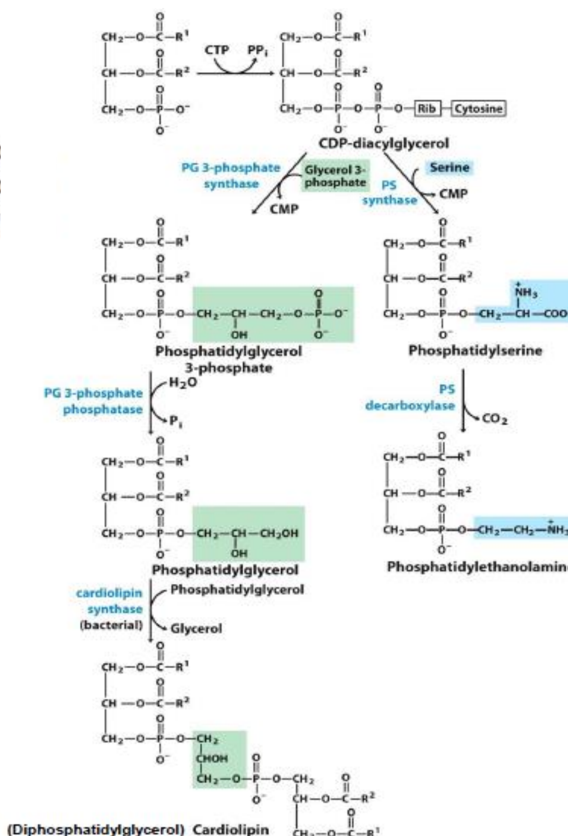
סינטזה של טריגליצרידים מוגברת על ידי אינסולין. בחולי סכרת, קשה לסנתז טריגליצרידים (כי בתאים אין מספיק גלוקוז), לכן הם מפרקים חומצות שומן לאנרגיה ויוצרים גופיפי קטו.

פירוק של טריגליצרידים מואץ על ידי גלוקוגון ואפינפרין.

פוספוליפידים :

פוספטידאט הוא הפרה-קורסר לגליצרופוספוליפידים. יצירת פוספוליפידים עם ספינגוזין תהיה שונה כי צריך שלד שונה של ספינגוזין.

פוספוליפידים מיוצרים בממברנת ה-ER, בגולג׳י ובממברנה הפנימית של המיטוכונדריה.



קודם צריך להיות שפעול לאחד משני מרכיבי הריאקציה. השפעול מתבצע על ידי ציטוזין (CTP). יש שתי אסטרטגיות- לשפעל את הכהל או לשפעל את הפוספטידאט :

1. שפעול הפוספטידאט : ה-CTP מאבד פוספט ונקשר לפוספטידאט. מתקבל דיאצילגליצרול קשור ל-CDP. אז יבוא האלכוהול, שידחוף את ה-CDP החוצה ויתקבל הפוספוליפיד, ו-CMP.

התהליך הזה הוא גמיש, כי קבוצת הכהל יכולה להשתנות- אינוזיטול, גליצרול-3-פוספט, סרין. כדי לקבל את הפוספטידיל-אתנולאמין צריך לעבור קודם בפוספטידיל סרין (ענף ימין). כדי לקבל את הקרדיוליפין (ענף שמאל), צריך לעבור בפוספטידיל גליצרול. האנזים שמייצר את הקריוליפין מפוספטידיל גלירצול שונה בין חיידקים ואאוקריוטים. הבדל נוסף- באאוקריוטים, את הפוספטידיל אינוזיטול מקבלים מהפוספטידיל גליצרול, על ידי החלפת קבוצת הראש. בחיידקים, פוספטידיל אינוזיטול מתקבל ישר מ-CDP דיאציל גלירצול.

חומצות השומן R1, R2, כמובן יכולות להשתנות ולכן כל פוספוליפיד כזה הוא משפחה של פוספוליפידים. בפוספטידיל אינוזיטול, לרוב הן כן יהיו קבועות.

2. שפעול הכהלים על ידי ה-CTP. קודם קבוצת האלכוהול משפועלת על ידי פוספורילציה, ובצורה הזו היא מגיבה עם ה-CTP ליצירה של CTP-alcohol. אז הוא מגיב עם הפוספטידאט ונוצר הפוספוליפיד.

פוספטידיל כולין הוא הפוספוליפיד הנפוץ ביותר ביונקים. מהווה 50% ממברנת הפלסמה. צריך לצרוך הרבה כולין בדיאטה. במידה והכולין זמין בצורה מספקת, הוא יווצר על ידי שפעול הכולין, בתהליך שתואר למעלה.
אם הכולין נמצא במחסור, הגוף ייצר פוספטידיל כולין מפוספטידיל אתנול אמין בסדרה של שלוש מתילציות. זה תהליך שקורה בכבד, כי רק שם נמצא האנזים שעושה את המתילצות.
עודף של כולין גם לא טוב. חיידקי המעי לוקחים את עודף כולין והופכים אוותו ל-TMA (טרימתיל אמין). בכבד הוא יעבור אוקסידציה ויהפוך ל- TMAO. ריכוז TMAO נמצא בקורלאציה להתפתחות אתרוסקלרוזיס- הוא מוביל לשקיעת של כולסטרול בדפנות כלי הדם. המנגנון בו זה קורה לא ידוע.

פוספטידיל סרין גם יכול להיווצר מפוספטידיל אתנולאמין על ידי שתי מתילצות, או על ידי חילוף הראש האלכוהולי.

ספינגוליפידים:

תוצר הסינתזה הראשון הוא הצרמיד. הקבוצה האמינית של הצרמיד צריכה להיות משופעלת. ב-4 שלבים שיתרחשו ב-ER ובגולג׳י יתקבל הספינגוזין.

*היא חזרה והדגישה שלא צריך ממש לדעת כל סינתזה, אלא להבין שיש המון סדרות של סינתזה, שהחלו כולם מחומצת השומן.
כאן מתחילים מפאלמיטט (16 פחמנים) קו-A, מצמידים לו סרין, מה שמקנה לו את החלק האמיני. אז מתווספת חומצת השומן. בסוף מתווסת הקבוצה הפולרית (סוכר או מיאלין).

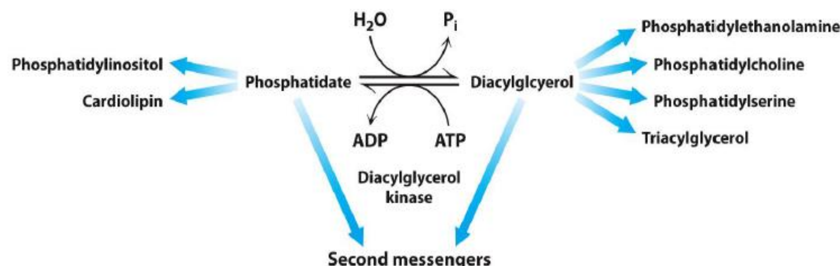
תפקיד הספינגוליפידים לא ברור לחלוטין. הם נמצאים בריכוז גבוה ב-lipid rafts, וכנראה יש להם משמעות רבה כשליחים שניונים שמתווכים סיגנלים של חיים ומוות. קובעים אם התא יופנה לאפופטוזיס או השרדות.

גנגליוזידים:

הגנגליוזידים הם ספינגו-ליפידים יותר משוכללים. יש עליהם הרבה שיירי סוכר. הם גם נמצאים ב-lipid rafts בריכוז גבוה, וחשובים להעברת אותות. בבלוטת יתרת המוח הם רצפטורים להורמונים.

בקרה על סינתזת ליפידים

כל צורות הסינתזה שהזכרנו מבוקרות על ידי האנזים ליפין, שמפרק פוספטידאט ל-DAG. גם הפוספטידאט, וגם ה-DAG חשובים להעברת אותות.
הליפין קובע איזו סוג ליפידים יעבור סינתזה. כאשר הוא פעיל, מסונתזים טריגליצרידים, פוספטידיל סרין, פוספטידיל כולין ופוספטידיל אתנול אמין. כאשר הוא לא פעיל, יש אנזים אחר שעובר- דיאצילגליצרול קינז, ואז נקבל יותר קרדיוליפין ואינוזיטול.



פעילות הליפין נקבעת על ידי זרחון. במצב מזורחן הוא בציטופלסמה, ובמצב לא מזורחן הוא על ממברנת ה-ER, וזה המצב הפעיל שלו.

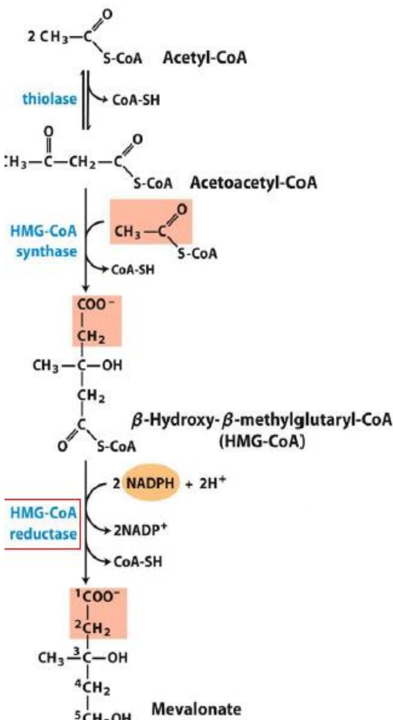
נוק אאוט שלו בעכברים גורר אובדן משקל רציני. הם מאבדים מסת שומן. כאשר הוא מבוטא בעודף, העכברים מאוד שמנים.

כולסטרול

כולסטרול משמש כמרכיב קריטי בממברנות, ודואג לייצוב שלהם. בנוסף, כולסטרול הוא הבסיס לסינתזה של הורמונים סטרואידים ומיצי מרה.

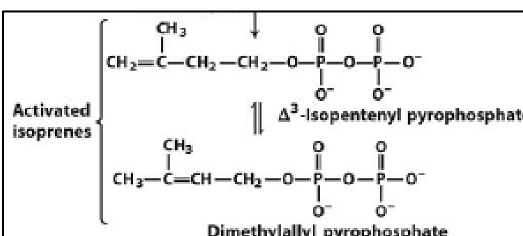
סינתזה של כולסטרול:

אתר הסינתזה העיקרי הוא הכבד. יתר הרקמות יודעות לסתנז כולסטרול ברמה נמוכה. תחילת הריאקציה היא בציטופלסמה וסיומה ב-ER. היא כוללת ארבעה שלבים עיקריים:

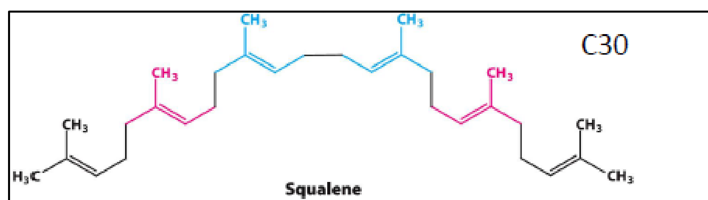


1. כל אטומי הפחמן של הכולסטרול (27 פחמנים) מקורם באצטט (מולקולה של שני פחמנים).
בשלב הראשון הופכים את האצטט ל-mevalonate.
זה שלב קובע קצב, לא הפיך, שנתון לרגולציה מחמירה.
תחילת הריאקציה היא כמו ביצירת גופיפי קטו: אנזים תיאולז הופך את הופך שני אציטל קו-A לאצטו-אצטיל-קו-A, ואנזים HMN-CoA-סינתז הופך אותו לביתא-הידרוקסי-ביתא מתילגלוטריל-קו-A. עד פה זה כמו ביצירת גופי קטו, למעט ההבדל שהאנזים HMN-CoA-סינתז בריאקציה הזו הוא איזופורם של הסינתז ביצירת גופי קטו. האנזים בריאקציה הזו פועל בציטופלסמה והאנזים בריאקציה ליצור גופי קטו פועל במיטוכונדריה.
בשלב האחרון ה-HMN-CoA הפוך למוואלונאט ע"י אנזים HMN-CoA רדוקטז, תוך פירוק 2 מולקולות NADPH. הרדוקטאז הוא אינטגרלי בממברנה של ה-ER, והוא זה שאחראי על הריאקציה הלא הפיכה בתהליך.
המוואלונט הוא מולקולה של 6 פחמנים.

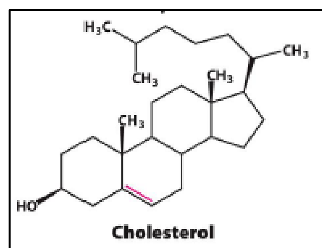
2. יצור מולקולות איזופרן משופעלות.
כדי לקבל איזופרנים ממוואלונאט משקיעים 3 מולקולות ATP. הם מזרחנות את המוואלונט בשלוש ריאקציות עוקבות (כל פעם מוסיפים זרחן אחד), ואז נעשת דה-קרבוקסילציה, כך שהאיזופרן הוא עם 5 פחמנים. מתקבלים בתהליך שני איזומרים של איזופרן- האחד הוא איזופנטיניל פירופוספט, והשני הוא די-אתילאליל פירופוספט. ההבדל ביניהם הוא במיקום הקשר הכפל. שניהם נוצרים באותה הכמות, ונמצאים בש"מ זה עם זה. הם נחשבים איזופרנים משופעלים בגלל הפוספטים שעליהם. גם תהליך זה קורה בציטופלסמה.



3. דחיסה של 6 איזופרנים משופעלים לקבל squalene, מולקולה של 30 פחמנים. הסדר בו נעשית הדחיסה הוא:
2 האיזומרים של האיזופרן (5 פחמנים כל אחד) נדחסים ליצירה של גרניל פירופוספט (10 פחמנים), שנדחסים עם עוד איזופרן ליצירה של פארנזיל פירופוספט (15 פחמנים). ואז שני פארנזאלים נדחסים ליצירה של סקוולן (30 פחמנים).



ריאקציה זו מתרחשת ב-ER.
תוצר הביניים איזופרן חשוב גם לריאקציות אחרות. למשל הם מהווים פרה-קורסרים לסינתזה של ויטמנים. בצמחים הם פרה-קורסרים לסינתזה של גומי/שרף. בחיות, הם משמשים ליצירה של גרניל (זו מולקולה שמוסיפים אותה על חלבונים אחרים כמודיפיקציה פוסט תרגומית). חלבוני ה-ras וה-rab למשל עוברים מודיפיקציה של גרניל.



4. סקוולן עובר שפעול וציקלאיזציה, ומתקבל כולסטרול- מולקולה בעלת מבנה טבעתי קשיח, של 4 טבעות. שלב המתרחש ב-ER.
השפעול הוא ע״י תוספת של אטום חמצן, מה שהופך את הסקוולן לסקוולן-אפוקסיד. זאת תוך ניצול NADPH. מהסקוולן המשופעל מתחילות להתקבל טבעות ע״י אנזים ציקלז, תוצר הביניים הוא לנוסטרול. אז בסדרה של 19 ריאקציות יצאו 3 פחמנים ויתקבל הכולסטרול.

*אמרה שלא צריך ממש ללמוד את כל רשימות האנזימים. יש לשים דגש על האנזימים שדיברנו עליהם בכיתה. חשובים העקרונות והתהליכים.

העלות האנרגטית ביצור כולסטרול:

בסה״כ צריך 18 מולקולות אציטל קו-A, 18 מולקולות ATP (כל שפעול של איזופרן דורש 3 ATP. משפעלים 6 איזופרנים), ו-14 מולי NADPH (כל יצירת מוולונאט דורשת 2 NADPH, יצירת הסקוולן עוד NADPH, והציקליזציה גם).
מאבדים 9 פחמנים (בשלב שפעול האיזופרן יאבד פחמן אחד, וזה יקרה 6 פעמים, ובעת הציקליזציה מאבדים 3 פחמנים).

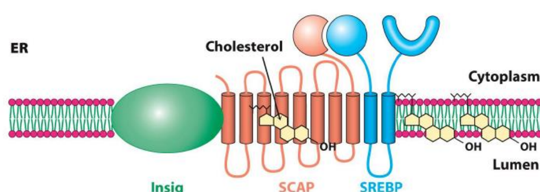
שלב:	NADPH	ATP	איבוד CO_2	Acetyl CoA	מספר מולקולות
ציקליזציה של squalene	1 NADPH		3 CO_2		1
דחיסה של 6 מולקולות איזופרן	1 NADPH				6
יצירת מולקולות איזופרן משופעל		3 ATP	1 CO_2		6
יצירת mevalonate מאצטיל CoA	2 NADPH			3 acetyl CoA	6
סה"כ	(6 x 2) + 2 = 14	6 x 3 = 18	(6 x 1) + 3 = 9	6 x 3 = 18	

מעט מהכולסטרול שסונתז הולך לממברנה. חלק הופך לסטרואידים, לויטמינים, או נשלח לרקמות אחרות. אם הוא מיועד לרקמות אחרות, עליו למצוא דרך להיות משונע בדם. הצעד הראשון הוא לחבר אותו לחומצת שומן ככולסטרול-אסתר. זה הופך אותו ליותר הידרופובי ומונע את כניסתו לממברנה. אופציה נוספת היא חיבור של הידרוקסיל לכולסטרול (נוצר הידרוקסי-כולסטרול), ומולקולות אלו חשובות לרגולציה על הסינתזה.

<u>בקרה על סינתטזת כולסטרול</u>

הבקרה העיקרית היא על ה-HMG-CoA-רדוקטאז שמשתתף בהפיכת אציטל קו-A למוולונט. הוא נתון לכמה רמות של בקרה, כי סינתזה של יותר מידי כולסטרול היא רעילה:

1. **ברמת השעתוק**. לגן האנזים יש פרומוטור בעל אלמנט רגולטורי. במידה ויקשר אליו פקטור שעתוק בשם sterol regulatory element binding protein (SREBP) הגן ישועתק. באופן רגיל ה-SREBP קשור לממברנה של ה-ER עם חלבון נוסף בשם SERBP cleavage activating protein (SCAP) . כאשר רמות הכולסטרול נופלות, ה-SCAP ילווה את ה-SREBP לגולג׳י, שם הוא יעבור שני חיתוכים פרוטאוליטים (על ידי מתלופרוטאז וסרין פרוטאז), מה שישחרר את החלק שנקשר ל-DNA בתוך ה-SREBP. אותו דומיין יגיע לגרעין ויאפשר שעתוק של האנזים.
כשרמות הכולסטרול תקינות או גבוהות, חלבון ה-SCAP ו-SREBP קשורים לממברנת ה-ER, ולא יכולים לעבור שפעול. ה-SCAP נמצא באסוציאציה עם חלבון INSIG (insulin induced gene). ה-SCAP וה-INSIG הם סנסורים של

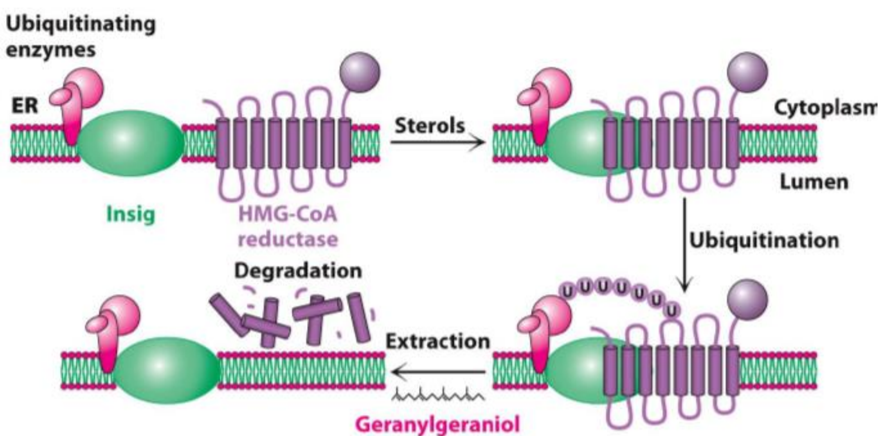


כולסטרול. ברגע שהכולסטרול קיים במידה מספקת, הוא יגרור שינוי מבני שיחזק את האסוציאציה בין ה-INSIG ל-SCAP. ברגע שהכולסטרול יהיה חסר, האסוציאציה תחלש ויתאפשר ניתוק של ה-SCAP וה-SREBP.

*האסוציאציה בין ה-SCAP וה-INSIG נעשית על ידי כולסרול או הידרקוסי-כולסטרול, ולכן הוא מהווה רגולטור לסינתזה של כולסטרול.

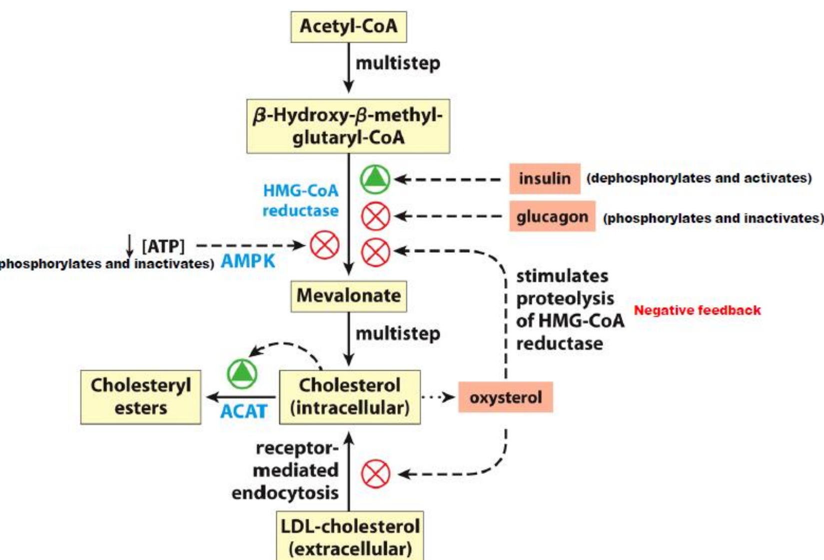
2. **ברמת התרגום.** הפארנזיל (תוצר הביניים של 15 פחמנים מהסינתזה), במנגנון לא ידוע מעכב את התרגום של הרדוקטז.

3. **ברמת הפירוק, דגרגציה**. חלק מה-INSIG נמצא באסוציאציה ל-E3 ליגז (אנזים שעושה יוביקוויטינציה). רמות גבוהות של כולסטרול מובילות לשינוי מבני של אנזים הרדוקטז. זה חושף שייר ליזין שרגיש ליוביקוויטינציה, וכך הרדוקטאז מסומן לפירוק בפרוטאוזום. לאחר היוביקוויטינציה, תתרחש מודיפיקציה של geranylgeraniol, שתאפשר את יציאת האנזים מתוך הממברנה וכך הוא יוכל לעבור פירוק על ידי הפרוטאוזום.



אם כך, הכולסטרול מפחית שעתוק ותרגום, וכן מאיץ את הפירוק.

4. **ברמת הפעילות**. פעילות הרדוקטאז מבוקרת על ידי זרחון. במצבו המזורחן הוא אינו פעיל. הזרחון מתבצע על ידי AMP-קינז. ה-AMP קינז מופעל כאשר יש הרבה AMP (ע״י אנזים אחר בשם AMP-קינז-קינז), וזה קורה ברעב. יש לזכור שה-AMP-קינז מזרחן גם את ה-ACC, ולכן מגביל סינתזה של כולסטרול במקביל להגבלת הסינתזה של חומצות שומן.



סיכום הבקרות

האנזימטיות/אלוסטריות/הורמונליות :

^ אינסולין--> יגביר סינתזת כולסטרול.

^ גלוקגון--> יעכב סינתזת כולסטרול.

^ רמת אנרגיה נמוכה--> תעכב סינתזת כולסטרול.

^ הרבה כולסטרול --> יעכב סינתזת כולסטרול.

5. **ברמת השינוע**.

לא פירטה בכיתה.

טרנספורט של כולסטרול וטריגליצרידים בדם

הם מסותנזים בכבד (וקצת במעי), נאגרים ברקמת השומן, וצריכים להגיע לשריר, למוח ולאיברים אחרים. הפתרון הוא חלקיקים **ליפופרוטאינים**, המכילים מרכיב חלבוני וליפידים, כפי שראינו בכילומיקרונים. הליבה עשירה בכולסטרול, כולסטרול-אסתר, טריגליצרידים. במעטפת יש פוספוליפידים כי להם חלק הידרופילי.

החלק השומני עטוף בחלבונים, שעושים את הבקרה על התנועתיות של הגופיף. חלבונים אלו הם **האפו-ליפופרוטאינים.** מלבד ההכוונה לאיברי המטרה, הם עוזרים לליגזות לפרק את החלקיק כשצריך לפרק אותו.

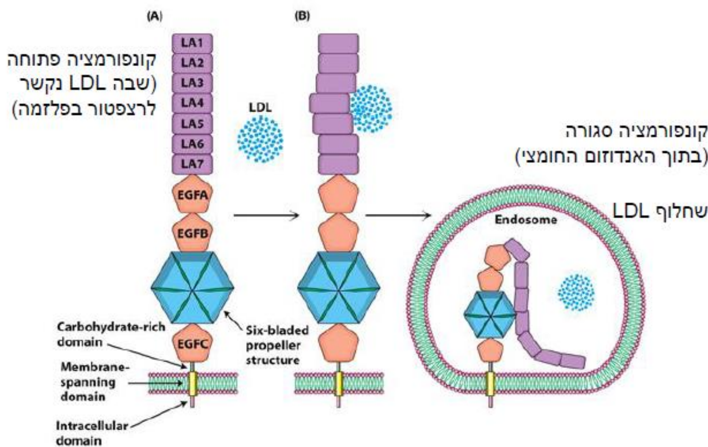
סוגי הליפופרוטאינים : הם דומים במרכיבים, ושונים בגודל ובצפיפות. ככל שהם מכילים יותר ליפידים, כך הם פחות צפופים. הכילומיקרונים הכי עשירים בטריגליצדירים, וה-HDL הכי עניים בהם.

1. **כילומיקרונים.** הם הכי גדולים, והכי פחות צפופים. 90% זה טריגליצרידים, השאר זה הליפידים האחרים והחלבונים.
   יש להם חלבון ייחודי להם בשם apo-B-48 (חלבון מאוד גדול).
   הם אוספים את השומנים מהדיאטה ומובילים אותם אל הרקמות. האוכל השומני מתפרק במעי לחומצות שומן, הן נקלטות על ידי תאי האפיטל של המעי (תאי entrocyte), שהופכות אותן לטריגילצירידים. שם הם גם נארזים ככילומיקרון ונעים בדם.
   חלבון ה-apoC-II, שנמצא על המעטפת של הכילומיקרון, משפעל בסביבת תאי המטרה ליפו-פרוטאין ליפז, שמפרק את הכילומיקרון. עם פירוק הכילומיקרון יוצאים הטריגליצרידים, ומפורקים מהם חומצות שומן, שנספגות ברקמות השונות (לאריזה או פירוק).
   שיירי הכילומיקרון שנותרו מכילים הרבה פחות טריגליצרידים, ועדיין את כל שאר המרכיבים של החלבונים, כלוסטרול, כולסטרול-אסתר, פוספוליפידים. השיירים נשאים בדם אל הכבד. ***זה המסלול החיצוני- אקסוגני.*** בכבד, יש רצפטור לחלבון אחר של הכילומיקרון- apoE. בעזרת רצפטור, הכילומקרון נכנס לתא הכבד, שם הוא מפורק בליזוזום. הכבד מייצר מהשיירים שפורקו את ה-VLDL.

2. **ה-VLDL (very low density lipoprotein).** בהם יש את אותם המרכיבים, אבל פחות טריגליצרידים מאשר בכילומיקרונים. ההרכב החלבוני גם דומה, אבל במקום ה-B48 יש apoB100, שהוא חלבון שנוצר מאותו הגן (בעצם ה-B48 הוא ה-B100 מקוצר, שעבר חיתוך). תפקידם של ה-VLDL הוא לשנע את הליפידים האנדוגנים שהכבד סינתז (הכולסטרול, הטריגלצרידים). ה-VLDL משופעל בקפילרות של תאי המטרה על ידי הליפז שקולט את ה-apo-C-II. חומצות השומן נלקחות על ידי תאי רקמת השומן או תאי השריר. לאחר הפירוק נותר VLDL מדולדל שנקרא **intermediate density lipoproteins (IDL)**. ה-IDL יגיעו לכבד, שם הם יפורקו, ויסונתזו שוב כ-LDL.

3. **ה-LDL (low density lipoproteins).** הם מכילים הכי הרבה כולסטרול וכולסטרול-אסתר בליבה.
   תפקידם הוא להביא את הכולסטרול שהכבד סינתז לרקמות, ולכן הם מבקרים כמה סינתזה חדשה של כולסטרול תהיה בכבד. כאשר יש מספיק כולסטרול בתאי הגוף, ה-LDL לא יפורק באיברי המטרה וישוב לכבד. הוא יקלט על ידי ה-LDL רצפטור בכבד, יכנס פנימה באנדוציטוזה ביחד עם הרצפטור, ויגיע אל הליזוזום לפירוק. בליזוזום יווצרו ממנו טיפות שומן, כולסטרול, חומצות שומן וחומצות אמינו. הכולסטרול החופשי יכול לעכב את סינתזת הכולסטרול האנדוגני (תוקע את ה-SREBP בממברנה, וכך מעכב את יצירת ה-HMG-CoA-רדוקטז).
   המסלול שעובר ה-VLDL עד הפיכתו ל-LDL, וחזרתו של ה-LDL לכבד הוא **המסלול האנדוגני.**
   אם ה-LDL ישקע בתאי האנדותל של הדם תיווצר טרשת.

הכולסטרול החופשי יכול גם לעבור רה-אסתריפיקציה ליצירה חדשה של כולסטרול אסתר (אבל זה יהיה עם חומצות שומן אחרות ממה שהוא היה קשור אליהם קודם. בצורתו של הכילומיקרון הוא היה קשור לח. לינוליאט. עכשיו הוא יקשר לפלמיטוליאט או אוליאט).



הרצפטור ל-LDL הוא טרנסממברנלי. יש לו כמה דומיין תוך תאי קצר, וכמה דומיינים חוץ תאיים (הדומיין שקושר את ה-LDL נקרא LA). בהיעדר LDL בסביבה, הרצפטור יושב עם קונפורמציה פתוחה באזור החוץ תאי. אם יש קשירה של ה-LDL, תהיה אנדוציטוזה של הרצפטור עם ה-LDL. בתוך הוסיקולה הרצפטור עובר לקונפורמציה הסגורה, ואז מתאפשר ניתוק בין ה-LDL והרצפטור. זה קורה באנדוזום (הבועית שנכנסה באנדוציטוזה). הרצפטור ישוב לממברנה, ה-LDL ימשיך אל הליזוזום.

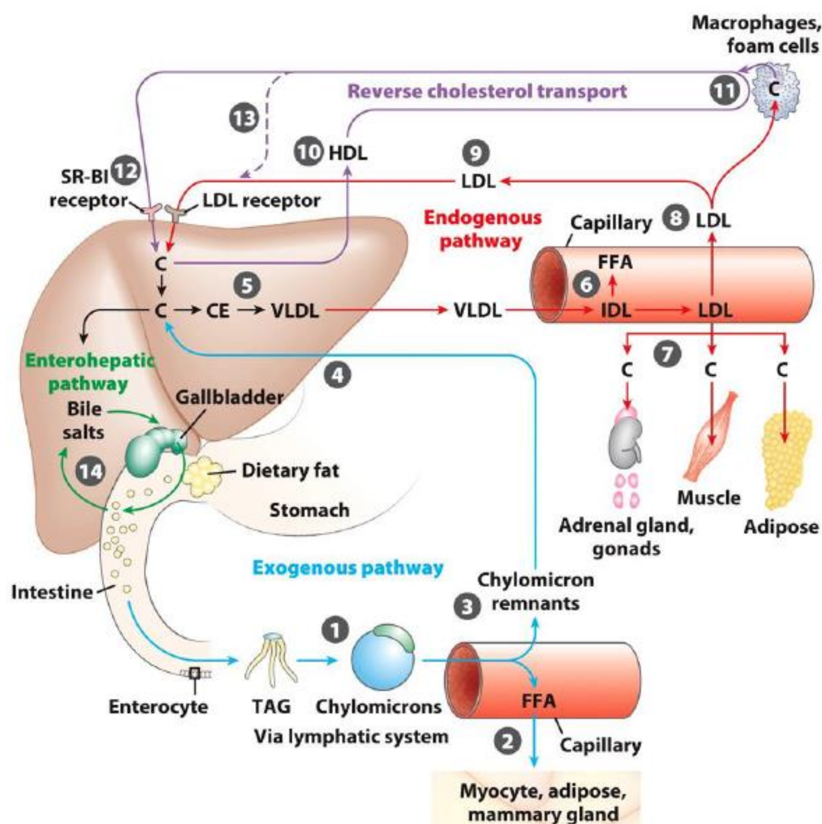
מוטציות ברצפטור גורמות **להיפרכולסטרולמיה משפחתית.** המוטציה היא אוטוזומלית דומיננטית. להטרוזיגוטים יש רמות גבוהות של כולסטרול בדם, ולהומוזיגוטים אפילו יותר. התמותה מאוד גבוהה בקרב הומוזיגוטים, בגילאים צעירים, עקב מחלות קרדיו-וסקולריות. כדי לשרוד הם זקוקים להשתלת כבד. הטרוזיגוטים בסיכון גבוה לטרשת. ביטוי קליני נוסף הוא שקיעה של הכולסטרול בתוך גופיפים שנקראים קסנטומות. רוב המוטציות הן באזורים שמתווכים מעבר בין קונפורמציה סגורה ופתוחה של הרצפטור.

טרשת עורקים-ארתרוסקלרוזיס: עודף בכולסטרול נאגר ברקמות השונות ובדפנות כלי הדם, בעיקר באזורים של פיצול לכלי דם קטנים (זה קשור בזרימה של הדם ולמערבולות בזרימה). כולנו מתחילים לפתח טרשת מהלידה, ובתהליך ארוך שנים ה- LDL עובר חמצון ל-oxLDL, ואז שוקע ושוקע בדפנות כלי הדם. מאקרופאג׳ים מזהים את ה-LDL המחומצן ובולעים אותו בפאגוציטוזה. מקרופאג׳ים שבלעו LDL מחומצן כדי לפרק אותו, הופכים לתאי קצף. תאי הקצף יכולים ליצור פלאק בדופן כלי הדם. הפלאק הולך וגדל ויכול לסתום את כלי הדם. במוח זה יגרום לשבץ, בעורק קורונרי זה יגרום ל-MI.

4. **ה-(HDL (high density lipoprotein.** אפשר לדמות אותו לשואב אבק, <u>תפקידם העיקרי הוא להחזיר כולסטרול חופשי מהדם ורקמות אחרות אל הכבד.</u> הוא מסונתז כחלקיק מאוד קטן, ובעת שנוצר כמעט ואינו מכיל כולסטרול וכולסטרול-אסתר (זה נחשב HDL חדש). הוא מכיל בעיקר חלבונים ופוספוליפידים. בנוסף יש בו אנזים LACT, שיודע לעשות מכולסטרול כולסטרול-אסתר. על המעטפת יש apo-A1. הוא נקשר לטרנספורטר ABCA1 שמעביר את הכולסטרול החופשי לתוך ה-HDL ובו הוא הופך לכולסטרול-אסתר. הכולסטרול שנשאב לתוך ה-HDL יכול להגיע מתאים מתים, משיירים של כילומיקרונים, מתאי קצף, מ-VLDL ומכולסטרול חופשי בדם. ה-HDL הבשל שב אל הכבד, ופורק בו את הכולסטרול שאסף (הרצפטור שקולט אותו הוא SR-BI). רוב הכולסטרול הזה ישמש ליצירה של מלחי מרה. זה מסלול ה-**reverse cholesterol phatway**.

ככל שיש יותר HDL, ה״שאיבה בדם״ יותר יעילה, ויש פחות כולסטרול בדם.

בעייה בטרנספורטר גורמת למחלת טנג׳יר בה יש המון כולסטרול בדם ובעיות קרדיו-וסקולריות בגיל צעיר.



סיכום המסלול של הכולסטרול:

מתחילים במסלול האקסוגני. השומנים בדיאטה מפורקים לח. שומן, בתאי האפיטל של המעי חוזרים לטריגלצרידים, נארזים ככילומיקרונים. נוסעים בדם ופורקים ח. שומן בתאי שריר ותאי שומן. שיירי הכילומיקרון חוזרים לכבד ומפורקים.

ממשיכים במסלול האנדוגני. הכולסטרול האנדוגני שיוצר בכבד הופך לכולסטרול-אסתר, נארז כ-VLDL, מגיע לרקמות, פורק חומצות שומן והופך ל-IDL. ה-IDL יאבדו עוד טריליצרידים, ויהפכו ל-LDL, שיחזרו לכבד (או שה-IDL יחזור כמו שהוא לכבד ושם יהפוך ל-LDL). ה-LDL יעשה את אותו מסלול בין הכבד לרקמות וישוב לכבד. בדרך חלק ממנו ישקע בדפנות כלי הדם. יווצרו תאי קצף.

מסלול ה-reverse: יווצר HDL בכבד שיסע בדם ויאסוף שיירי כולסטרול, אותם הוא יחזיר לכבד.

הנורמות של כולסטרול וטריגליצרידים בדם:

לא רצוי שיהיה הרבה כולסטרול כולל או הרבה LDL, והרבה טריגליצרידים.

הרבה HDL זה בסדר.

הגבולות האלו משתנים כל הזמן בהתאם למחקר.

	ערכי נורמה	ערכים רצויים	ערכים גבוהים (סיכון גבוה)
כולסטרול כולל (total)	110-200 mg/dL	100-200 mg/dL	> 240 mg/dL
LDL	60-130 mg/dL	< 70-100 mg/dL	> 130 mg/dL
HDL	30-120 mg/dL	> 40 mg/dL	
טריגליצרידים	30-190 mg/dL	< 150 mg/dL	> 200 mg/dL

כיצד ניתן לשלוט ברמות כולסטרול גבוהות מדי?

שתי דרכים:

1. ניתן לסנתז הרבה מלחי מרה. יש resin שקושר מלחי מרה במערכת העיכול, כך הם לא נספגים חזרה בגוף ויוצאים בצואה. לכן בכבד אפשר לסתנז יותר מלחי מרה מכולסטרול.
2. לעכב את סינתזת הכולסטרול האנדוגני, על ידי עיכוב הרדוקטז. זה נעשה על ידי סטטינים.

הסטטינים עושים כמה דברים מעבר לעיכוב הרדוקטז. היום יודעים שזו תרופה טובה לסרטן, אבל המנגנון לא ידוע. יש להם תופעות לוואי לא רצויות. זה יכול להוביל לכאבי שרירים בלתי נסבלים (אצל כ-15% מהנוטלים). לא ברור מה המנגנון בו סטטינים גורמים לכאבי שרירים, יש השערה כי הסטטינים מעודדים הפעלה של גן אטרוגין-1 שמפרק מסת שריר.

נגזרות חשובות של כולסטרול

1. מלחי מרה.

מוסיפים לכולסטרול קבוצות הידרוקסיל, מה שהופך אותם ליותר פולרים. כך הם מסייעים בהמסת השומנים שבדיאטה ובהנגשתם לליפזות. ככל שיש יותר מלחי מרה, סופגים יותר טוב את השומנים בדיאטה. מלחי מרה ראשונים נוצרים בכבד ונאגרים בכיס המרה. מלחי מרה שניוניים נוצרים מפעולת חיידקים במעי. אם יש יותר מידי כולסטרול במיצי מרה, הם יכולים לשקוע ולהפוך לאבני מרה. הטיפול באבני מרה הוא הוצאתם בניתוח או המסה שלהם כדי שיצאו בשתן.
שקף עם מסלול מלחי מרה- לא צריך לדעת.

2. הורמונים סטרואידים.

משמשים כמולקולות של העברת אותות ברמה הסיסטמית. יש 5 הורמונים שמסונתזים מכולסטרול:

1. הורמוני המין: פרוגסטרון, אסטרוגן, טסטוסטרון.
2. הורמון הסטרס קורטיזול.
3. אלדוסטרון, ששולט על משק המלחים בכליה. לכן יש לו השפעה גם על נפח הדם ולחץ הדם.

כל ההורמונים הסטרואידים הם פקטורי שעתוק. אין להם רצפטור חיצוני בממברנה, הם יכולים לחצות את הממברנה של איבר המטרה בדיפוזיה. יש להם רצפטור פנימי בציטופלסמה, וכאשר הם נקשרים אליו, ההורמון והרצפטור מובלים לגרעין, נקשרים לאלמנט ב-DNA ועושים שעתוק. לעיתים הקומפלקס רצפטור-הורמון לא נכנס לבד לגרעין אלא צריך להיקשר לקומפלקס נוסף כדי להגיע לגרעין. זה מגדיל את רמות הבקרה.

3. ויטמין D.

אחד מהויטמינים הנחוצים בגוף. הוא נוצר מכולסטרול בשורה של צעדים, ולשם כך צריך אור UV שנקלט מהשמש. ויטמין D חשוב לבקרה על המטבוליזם של סידן וזרחן. חוסר בויטמין D גורם לרככת- החלשות העצמות, בגלל חוסר בסידן וחסר בהתסתיידות של עצם וסחוס. אנשים שחולים ברככת הם בעלי עצמות רכות ולא יציבות, מתקשים בתנועתיות, ומפתח הרגלים שלהם צורת O, מה שמקשה עליהן לשאת את המשקל של הגוף.

אינטגרציה של מטבוליזם שומנים וסוכרים

מטבוליזם מתייחס לשיווי משקל בין תהליכי הבנייה (אנבוליזם) לתהליכי הפירוק (קטבוליזם). הגוף כל הזמן מתנדנד בין מצבי רעב ושבע.

ציינו בעבר את הרגולציה ההורמונלית ע"י הורמוני הרעב (והסטרס) גלוקגון ואפינפרין, והורומון השובע אינסולין. זו לא כל התמונה, יש עוד מספר רב של הורמונים, ציטוקינים, פפטידים ושאר metiators שמכתיבים את התהליכים. כך למשל גרלין, אדיפוקינים (ציטוקינים שמייצרת רקמת השומן והם בעלי השפעה סיסטמית).

באורגניזמים רב תאיים יש תקשורת בין התאים, והמטרה היא שסך האורגניזם כולו יפיק תועלת, ולא תא מסוים. כל תא אחראי על תפקיד שונה ויש לו צרכים מיוחדים. לכל רקמה יש גם העדפה לדלק מטבולי אחר. כך למשל רקמת השומן החומה אחראית על יצור חום, ולשם כך היא מפרקת שומן שנאגר ברקמת השומן הלבנה.

נתונים על מטבוליזם באיברים שונים:

המוח רק מקבל אנרגיה ולא מייצר. תפקידו הוא לבקר את פעילות שאר האיברים. הוא יודע לנצל גלוקוז או גופי קטו בלבד.

בשאר האיברים, הדלק המועדף הוא חומצות שומן. לשרירים- גם שרירי השלד וגם שריר הלב, יש מאגרי גליקוגן, וכך גם לכבד.

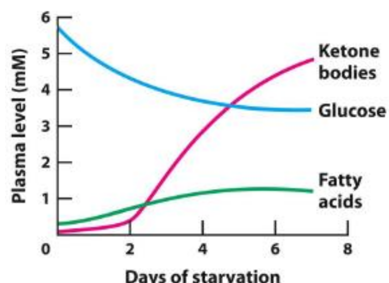
בכבד (וברקמת השומן) נאגרים בנוסף גם טריגליצרידים, אותם הם יכולים לפרק ולשלוח לרקמות אחרות שצריכות חומצות שומן.

איבר	מאגר אנרגיה	"דלק" מועדף	ייצוא חומר אנרגטי ("דלק")
מוח	אין	גלוקוז גופי קטו (ברעב)	אין
שריר שלד (במנוחה)	גליקוגן	חומצות שומן	אין
שריר שלד (במאמץ)	אין	גלוקוז (מפירוק גליקוגן)	לקטט
שריר הלב	גליקוגן	חומצות שומן	אין
רקמת שומן	טריגליצרידים	חומצות שומן	חומצות שומן, טריגליצרידים
כבד	גליקוגן, טריגליצרידים	גלוקוז, חומצות שומן, חומצות אמינו.	חומצות שומן, גלוקוז, גופי קטו

סדר העדפה של שימוש: גליקוגן > TGs > חלבון

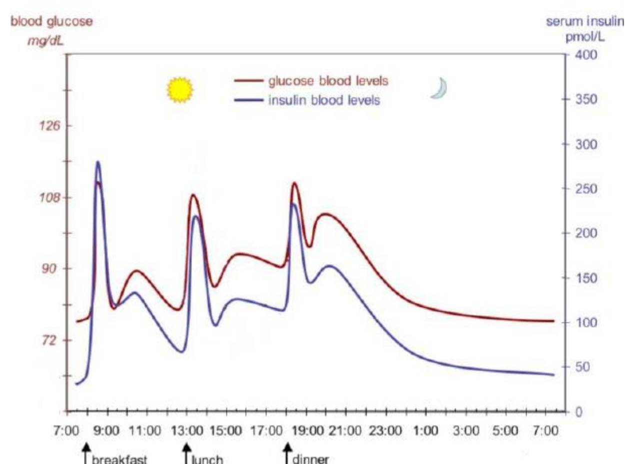
הכבד הוא "המלך" של המטבוליזם. הוא אחראי על רגולציה של כל התהליך המטבולי. בנוסף לחומצות שומן, יכול לייצא גם גלוקוז וגופי קטו.

בגוף יש שמירה על הומאוסטזיס. מטרת ההומאוסטזיס היא לשמור על ערכי הגלוקוז בדם בטווח קבוע, כדי להזין את המוח והלב באספקה הקבועה של גלוקוז. בשובע, אסור שערכי הגלוקוז יעלו על 110mg/dL, ובעת רעב, אסור שהם ירדו מתחת ל-60mg/dL.



מטרה נוספת של הומואוסטזיס היא לשמר את החלבונים. לכן ברעב, קודם יהיה ניצול של הגליקוגן, רק אז של חומצות השומן ורק בסוף החלבונים. חומצות השומן שיפורקו ברעב יופנו לספק אנרגיה לאיברים לא חיוניים, כדי שהגלוקוז שנותר בגוף יגיע למוח. אם הרעב ימשך זמן רב, ומאגרי הגלוקוז יתרקנו, חומצות השומן יופנו ליצירה של גופי קטו שיזינו את המוח.

רמות הגלוקוז בדם משתנות לפי אכילה, פעילות ושינה. רמות האינסולין בדם משתנות בהתאם לרמות הגלוקוז. בזמן שנת הלילה רמות הגלוקוז והאינסולין יורדות בתוך הטווח התקין. לאחר ארוחה רמתן עולה ואז יורדת בהדרגה.



המוח: המוח הוא צרכן האנרגיה העיקרי, הוא צורך 20% מהאנרגיה במנוחה. צריכת האנרגיה שלו היא ללא קשר לרמת הפעילות. לכן הוא זקוק לאספקה קבועה של אנרגיה, שמגיעה בצורה של גלוקוז או גופי קטו. חומצות שומן וגליקוגן כאמור לא מנוצלים על ידי המוח.

השריר : השריר אחראי לצריכה של 30% מהחמצן המולקולרי במנוחה. מאגרי האנרגיה שלו הם גליקוגן ופוספוקריאטין (מאגר אנרגיה ייחודי לשריר). הפוספוקריאטין נמצא בש״מ משקל עם קריאטין. פוספוקריאטין קינז מזרחן אותו (ומפרק ATP) וגם עושה לו דה-פוספורילציה ומייצר בכך ATP. בשניות הראשונות של כיווץ השריר, הפוספוקריאטין הוא זה שמתפרק, ותוצר הפירוק קריאטין מגיע לשתן. כשמאגריו נגמרים, השריר עובר לפירוק גליקוגן. נוכחותו הקינז בדם מהווה אינדיקציה להרס של השריר (השריר פורק על מנת לקבל ATP).

Phosphocreatine + ADP ⇌ ATP + Creatine
Creatine Kinase (CK)
during activity
during recovery

האנזים מסונתז על ידי שני גנים, ומתפקד כדימר. ידועים שלושה איזופורמים שלו : BB (הנפוץ במוח), MM (הנפוץ בשריר השלד), ו-BM (הנפוץ בשריר הלב). באוטם שריר הלב אפשר לעקוב אחרי רמות האיזופורם הללבי בדם כדי לדעת אם היה אוטם.

שריר השלד הוא בעל מאגר גליקוגן גדול. הגליקוגן הוא רק 2% ממסת השריר. זאת לעומת הכבד, ש-10% ממסתו היא גליקוגן. אבל מאחר ויש הרבה יותר רקמת שריר מכבד בגוף, אז 75% מהגליקוגן בגוף מצוי בשריר.

השריר אינו מייצא גלוקוז, ולכן לא עושה גלוקוניאוגינזה (אין לו בכלל את הפוספטאז הנחוץ לייצר גלוקוז מ-G6P). אולם במאמץ הוא מייצר לקטט שיגיע לכבד לגלוקוניאוגינזה (מעגל קורי). אין לו רצפטורים לגלוקגון.

יש שני סוגים של **שרירי שלד**. האחד הוא שרירים שמתכווצים לאט, כמו שריר הגב. השני הוא השריר המהיר שמתכווץ במהירות ובפתאומיות, כמו שרירים של העין.

	Slow-twitch muscle (red muscle)	Fast-twitch muscle (white muscle)
דוגמאות:	שריר הגב	שרירי העין
סיבים:	דקין	עבים
מיוגלובין:	הרבה (לכן אדום)	מעט (לכן לבן)
מיטוכונדריה:	הרבה	פחות
כיווץ:	איטי וממושך	מהיר
מטבוליזם:	אירובי (oxidative phosphorylation)	אנאירובי (גליקוליזה)
לקטט:	אין הצטברות	יש הצטברות
עבודה/ פעילות:	לתקופה ממושכת בלי להתעייף	מהירה וקשה לפרקי זמן קצרים, מתעייף מהר

יש להם תפקידים שונים, ולכן מספר הבדלים. השרירים שמתכווצים לאט צריכים לעבוד לתקופה מתמשכת בלי להתעייף. מה שמעייף את השריר הוא הלקטט, ולכן עושים בעיקר מטבוליזם אירובי. לשם כך הם זקוקים להרבה מיטוכונדריות ומיוגלובין.

שרירים שמתכווצים מהר צריכים לעבוד מהר וקשה לפרקי זמן קצרים. לכן הם עושים יותר מטבוליזם אנ-אירובי. משום כך הם זקוקים לפחות מיוגלובין ומיטוכונדריות, וכן מצטבר בהם לקטט.

שריר הלב מאוד תלוי בפעילות אירובית, ועל כן הוא מאוד עשיר במיטוכונדריות. הוא משתמש בגלוקוז ובגופי קטו לאנרגיה, אבל הכי מעדיף חומצות שומן. יש השערה שזה בגלל שאספקת חומצות השומן היא יותר סדירה, בניגוד לאספקת הגלוקוז שנעה בין מצבי רעב ושובע. מאחר והלב זקוק לאספקה קבועה וגבוהה של אנרגיה, הוא יעדיף מקור אנרגיה יציב.

רקמת השומן : רקמת השומן יוצרת ומאחסנת את הטריליצרידים. היא מהווה מאגר אנרגיה מאוד גדול- 21% ממסת הגוף של גברים, ו-25% ממסת הגוף של נשים. רקמת השומן צריכה גלוקוז כדי ליצר טריגלצרידים, כי אין לה גליצרול קינז. מהגלוקוז היא יוצרת את ה-G3P שנחוץ לייצור הפוספטידאט. (הכבד יכול לייצר G3P מגליצרול. לא חייב גלוקוז). עיקר הבקרה על סינתזה/פירוק של חומצות שומן היא על ידי אינסולין ואפינפרין.

הכליה : הכליה עסוקה בלייצר שתן ולפנות מלחים ומטבוליטים שונים מהגוף. ברעב, הכלייה הופכת לאיבר מטבולי, והיא איבר מרכזי שעושה גלוקוניאוגינזה (ביחד עם הכבד). 50% מהרמת הסוכר בדם ברעב הגיעה מהכליה.

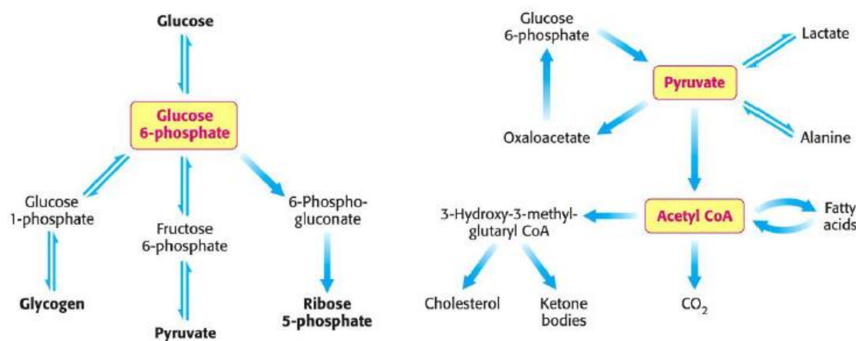
הכבד : הכבד מפיץ את האנרגיה לכל איברי הגוף השונים. הוא צומת אינטגרציה של כל המטבוליטים. הכבד יודע להגיב לצרכים של הרקמות השונות ולמצבי הגוף השונים, ולהחליט אם לסתנז או לפרק חומרים שונים. בזמן שובע הם מסנתז טריגליצרידים, ומסיע אותם בגוף כ-VLDL. בזמן רעב, הוא מייצר גופי קטו. בנוסף הוא אחראי על דה-טוקסיפיקציה (נטרול רעלים). המזון המערבי מכיל הרבה רעלים. הכבד מפרק אותם ומפנה אותם מהגוף.

גלוקוז-6-פוספט הוא צומת הבקרה המרכזי בכבד. המסלול אליו הוא ילך יכתיב לאן ילך המטבוליזם- אם למעגל הפנטוז פוספט, לייצור גליקוגן או לסינתזה של ליפידים.

נקודות המפתח לבקרה של כל המסלולים הם : גלוקוז-6-פוספט, פירובט ואציטל קו-A.

לגלוקגון ואינסולין יהיו השפעות על כל אנזימי המפתח בתהליכים האלו, אולם בצורה הפוכה, כדי שלא יתרחשו שני תהליכים הפוכים במקביל.

כך למשל על גליקוליזה וגלוקוניאוגינזה יש בקרה הפוכה, על ידי אותם הגורמים. מה שמזרז את הגליקוליזה מעכב את הגלוקוניאוגינזה, ולהפך.



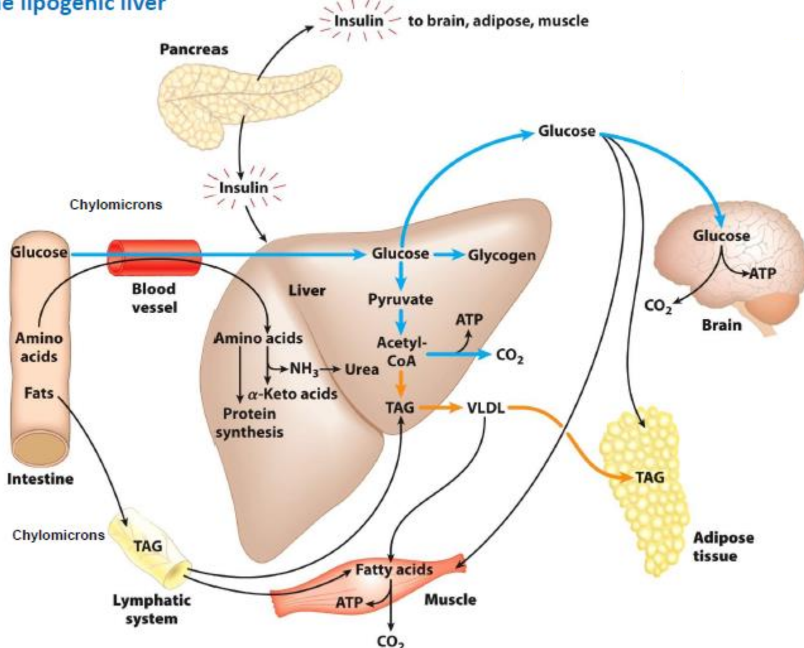
הפירובט יכול להפוך לאציטל קו-A (ע״י פירובט דה-הידרוגנז), דבר שיקרה יותר בשובע, או לאוקסלואצטט (ע״י פירובט קרבוקסילז), דבר שיקרה יותר ברעב. בשובע, האינסולין יאקטב את ההידרוגינז ויעכב את הקרבוקסילז, וברעב, גלוקגון יעשה ההפך- יאקטב את הקרבוקסילז ויעכב את הדה-הידרוגינז.

כנ״ל לגבי פירוק וסינתזה של גליקוגן, פירוק וסינתזה של חומצות שומן, פירוק וסינתזה של כולסטרול, שינוע של טריגליצרידים- מה שיקדם סינתזה יעכב פירוק, ומה שיקדם פירוק יעכב סינתזה. העקרון בכל הבקרות האלו שלא נעשה את הריאקציות ההפוכות בו זמנית.

סיכום-

מה קורה **בשובע**?

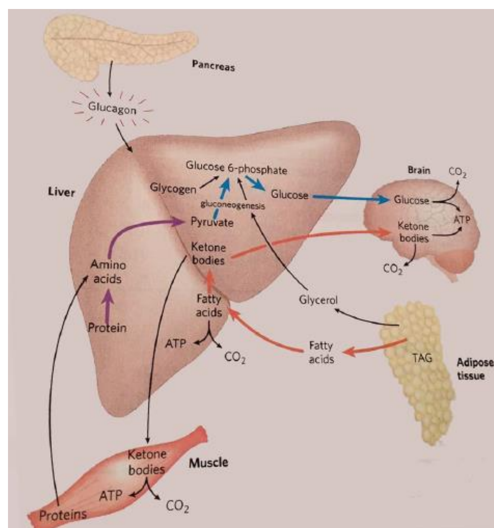
בכבד, האינסולין מקדם תהליכי של אגירה :
יצור גליקוגן, קידום גליקוליזה כדי ליצר פירובט ואז אציטל קו-A, כדי שניתן יהיה לסנתז את כל סוגי הליפידים-כולסטרול וחומצות שומן, שמהוות מקור לפוספוליפידים וטריגליצרידים.
אנזימים מאוקטבים : גליקוגן סינתז, PFK, פירובט דה-הידרוגינז, ציטרט שאטל, ACC, HMG-CoA reductase.



ברקמת השומן, אינסולין יקדם יצירה של טריגליצרידים. לשם כך תהיה צריכה של גלוקוז.

בשריר, יצור של גליקוגן.

במוח, מנוצל גלוקוז. אין אגירה של שום דבר.



במצב של **רעב**?

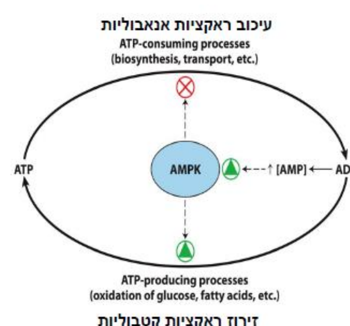
בכבד, גלוקגון יקדם יצור גלוקוז בגלוקוניאוגינזה, פירוק גליקוגן, פירוק חומצות שומן, ואם הרעב הוא ממושך אם גם יצור גופי קטו.

אנזימים מאוקטבים : גליקוגן פוספורילז, F1,6BPase, פירובט קרבוקסילז, CAT-1.

ברקמת השומן, לא עושים אפטייק של גלוקוז, פירוק טריגליצרידים.

בשריר פירוק חומצות שומן, פירוק גליקוגן, ניצול גופי קטו.

במוח, ניצול גלוקוז, אם הרעב ממושך אז גופי קטו.



שליח שניוני חשוב במטבוליזם הוא ה-AMPK. הוא קינז שפועל ברעב- מופעל על ידי גלוקגון, מעוכב על ידי אינסולין. בנוסף, עובר בקרה אלוסטרית על ידי AMP ו-ATP, וכן על ידי אדיפוקינים (ציטוקינים של רקמת שומן, כמו לפטין ואדיפונקטין).

ה-AMPK יזרז ריאקציות קטבוליות : ביתא אוקסידציה, יצירת גופי קטו, עיכוב סינתזה של כולסטרול, עיכוב סינתזה של חומצות שומן וטריגליצרידים, בקרה על סינתזת אינסולין. זה קורה על ידי בקרה על חלבונים ספציפיים ברקמות ספציפיות (הוא מזרחן כל מיני אנזימים בתהליכים הללו, וכך מעכב אותם או מאקטב אותם).

סיכום :

	בשובע-אינסולין	ברעב- גלוקגון ו-Epi	מיד לאחר ארוחה
בשריר	- זירוז כניסת גלוקוז - זירוז סינתזת גליקוגן	- שינוי בבחירת ה"דלק" מגלוקוז לחומצות שומן	
ברקמת שומן	- זירוז סינתזת גליקוגן - זירוז סינתזת TGs	- זירוז מוביליזציה של חומצות שומן	- חומצות שומן מעובדות כרגיל
בכבד	- זירוז גליקוליזה - עיכוב גלקוניאוגנזה - זירוז סינתזת גליקוגן - זירוז סינתזת ח' שומן	- זירוז פירוק גליקוגן - עיכוב סינתזת גיקוגן - זירוז גלוקוניאוגנזה - עיכוב סינתזת ח' שומן	- כניסה מאוחרת של גלוקוז, כדי שיוכל לשמש רקמות אחרות. - ניצול הגלוקוז שנוצר מגלוקוניאוגנזה ליצירת גליקוגן (חידוש מאגרים) - כאשר רמות הגלוקוז בדם עולות, הכבד מתחיל להכניס גלוקוז ולנצלו לשם לסינתזת חומצות שומן וטריגליצרידים

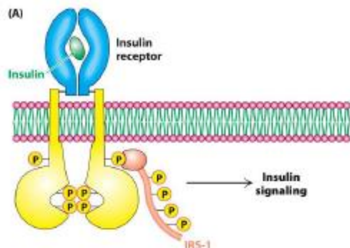
<u>סכרת</u>

טרנספורטרים של גלוקוז : ידועים 4 גנים לטרנספורטר גלוקוז (במצגת 5, אבל אחד הוא לפרוקטוז). נקראים glut1-4. לכל אחד יש KM שונה לגלוקוז.

טרנספורטרים 1 ו-3 רגישים לרמות נמוכות של גלוקוז. הם יכניסו תמיד גלוקוז, לשימוש התדיר של הרקמה.

טרנספורטר 2 מתבטא בעיקר בלבלב ובכבד. יש לו KM מאוד גבוה לגלוקוז. הוא יכניס גלוקוז בעת שיש הרבה אינסולין בדם. הלבלב מייצר אינסולין על סמך סינגל שיש הרבה גלוקוז. זה מושג על ידי הטרנספורטר 2 בלבלב. הכבד, ינצל הגלוקוז שנכנס דרך טרנספורטר 2 כדי לאפשר סינזתה של חומרי אגירה.

טרנספורטר 4 הוא עם KM ביניים. כמותו בממברנה משתנה לפי סינגל של אינסולין. כשיש הרבה גלוקוז בדם, אינסולין יוצר סיגנל שמעביר glut4 ממאגרים תוך תאיים לממברנת הפלסמה. זה תהליך מאוד מהיר. כך נכנס יותר גלוקוז לתאים.



הרצפטור לאינסולין : בנוי משתי תת יחידות- אלפא חיצונית, וביתא פנימית. זה הומודימר שנמצא בשלב פתוח כשאין אינסולין, ובמצב סגור כשנקשר לאינסולין. אינסולין עושה אוליגומריזציה של הרצפטור, מה שמפעיל טירוזין קינז. הרצפטור עובר זרחון, וכך גם יחידה שקשורה אליו- IRS-1 (insulin receptor substrate). ה-IRS המזורחן מפעיל קסקדת תהליכים בתא, שבסופה כניסה של גלוקוז לתאים.

תנגודת לאינסולין וסכרת סוג 2 :

אצל אנשים שמנים נפוצה סכרת סוג 2. השלב המקדים לסכרת סוג 2 היא **התסמונת המטבולית**. התסמונת המטבולית היא קלאסטר של כמה תופעות שצריכות להתקיים יחד :

(א) עודף שומנים בדם -דיסליפידמיה ; (ב) היפר גליקמיה -רמת גלוקוז עולה וחורגמת מהנורמה בדם ; (ג) תנגודת לאינסולין- מצב בו סף הרגישות של הרצפטור, לסובסטרט שלו אינסולין, הולך ועולה. יש כמה הסברים לכך שיש תנגודת אינסולין. אחד מהם אומר שרמות DAG בדם עולות עקב הדיאטה הלא מאוזנת. זה גורר הפעלה של PKC, שעושה עודף פוספורילציה ל-IRS1. לכן, אין הפסקה של הסיגנל מהרצפטור לאינסולין, הוא פועל ללא קשר לסיגנל חיצוני, ועל כן לא מגיב בצורה אפקטיבית כאשר הוא כן רואה אינסולין. לכן הרבה גלוקוז נשאר בדם ויש היפרגליקמיה. לכן גם רמות השומנים עולות.

תנגודת לאינסולין מובילה לסכרת כי הגוף נכנס ללופ- תאי הלבלב מנסים להגביר את ייצור האינסולין, כדי בכל זאת לייצר מסר ממנו. זה משבש את כל הבקרה על הסינתזה של האינסולין, ובסופו של דבר גורר תגובת עקה בתאים כי האינסולין שמיוצר בעודף לא מצליח להתקפל. זה מהווה טריגר לאפופטוזיס של התאים (בתגובה לעקה יש unfolded protein respone), והמצב הסופי הוא שאין ייצור של אינסולין בגוף. מדובר בתהליך ארוך שנים, שלא קורה בבת אחת, אלא הוא מחמיר באופן הדרגתי.

להיווצרות תנגודת לאינסולין יש הסבר אבולציוני. מטבוליזם הוא תהליך דינמי שמשתנה. בהיריון למשל, אישה צריכה לספק רמת גלוקוז קבועה למוח שלה ושל התינוק. רמת הגלוקוז בדם צריכה לעלות, כדי לספק מספיק אנרגיה לעובר. לכן טוב שתהיה קצת תנגודת לאינסולין, לפחות לפרק זמן מסוים.

אימון גופני משפר מצב סכרת סוג 2. בעת האימון, מוגבר הפירוק של חומצות שומן. בפירוק של חומצות שומן משתחרר קלציום. קלציום מעודד ביוגינזה של מיטוכונדריות. ייצור של הרבה מיטוכונדריות גורר עוד יותר פירוק חומצות שומן, וכתוצאה מכך נמנעת הדיסליפידיה. בנוסף, אימון גופני מגביר את הטרנסלוקציה של glut4 לממברנה, וכך נכנס יותר גלוקוז לתאים, ונמנעת ההיפרגליקמיה. האימון גופני המומלץ לסכרת סוג 2 הוא אימון אירובי בעוצמה נמוכה- הוא שורף טוב יותר שומנים מאשר אימון אינטנסיבי. זה קשור ליחס בין חמצן לפד"ח.

סכרת סוג 1 :

סכרת סוג 1 היא סיפור שונה לגמרי. זו מחלה אוטואימונית, בה מערכת החיסון מכירה אנטיגן ספציפי על תאי הלבלב והורסת אותם. כתוצאה מכך אין אינסולין, ואין מה שיכניס את הגלוקוז פנימה אל התאים. זה מצב של רעב בתוך השפע- רמות הגלוקוז בדם עולות בצורה היסטרית, ורואים אותן אפילו בשתן. אבל מאחר ובתאים אין גלוקוז, יש תחושה של רעב, ורמות הגלוקגון עולות בצורה דרסטית. כתוצאה מכך יש מעבר לשימוש בחומצות שומן. אם הסכרת אינה מטופלת, הכבד

מגביר את הגלוקוניאוגינזה, מה שמגביר עוד יותר את רמות הגלוקוז בדם. כל המעגל הזה הוא מאוד רעיל. לכן חולי סכרת סוג 1 שאינם מטופלים נכנסים לחמצת קטו.

*שקף חמצת קטוטית סכרתית- לא פירטה.

שאלת מחשבה- למה תאי סרטן מעדיפים גליקוליזה אירובית (תסיסה הומולקטית, גם כאשר יש חמצן בסביבה כדי לעשות רספירציה=אפקט ורבורג) ולא פירוק חומצות שומן? כמה השערות:

- הרבה גליקוליזה מייצרת הרבה לקטט. לקטט יוצא החוצה ומחמיץ את הסביבה של הגידול. כך תאי מערכת החיסון לא יכירו את הגידול כזר ולא יתקיפו אותו.
- תאי סרטן מתחלקים הרבה ולכן צריכים הרבה נוקלאוטידים. הם יעשו הרבה גליקוליזה, כדי לקבל הרבה גלוקוז-6-פוספט, שיוכל להיכנס למעגל הפנטוז-פוספט.
- בגלל קצב הגדילה המהיר יש היפוקסיה בסביבת תאי הגידול. אם התא מכוון מראש לעשות גליקוליזה אירובית, הוא יהיה יותר סתגלטני במצבים אנ-אירובים.